

ÉTUDE «IN VITRO» DU TRANSPORT DE MÉDICAMENTS À TRAVERS LA CORNÉE

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, **—**
mention sciences pharmaceutiques

par
Jacques **BARRELET**
NEUCHÂTEL

Thèse N° 1867

1970

Genève
Service Rapide Offset
1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545932_0003

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTÉ DES SCIENCES

Section de pharmacie
Pharmacie galénique

Professeur P. BURI

ÉTUDE «IN VITRO» DU TRANSPORT DE MÉDICAMENTS À TRAVERS LA CORNÉE

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention sciences pharmaceutiques

par
Jacques BARRELET
NEUCHÂTEL

Thèse N° 1867

Genève
Service Rapide Offset
1979

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs P. BURI, professeur ordinaire et directeur de thèse, M. VAN OOTEGHEM, professeur (Université d'Anvers) et G.C. GAMBA, docteur ès sciences (Zyma - Nyon) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 mai 1978

Le Doyen:
Bernard LEVRAT

Thèse N° 1867



Pour l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail en le dirigeant et en lui apportant ses encouragements, le professeur P. Buri trouvera ici le témoignage de ma reconnaissance. Celle-ci s'adresse également au Dr M. Tsacopoulos pour son aide et ses nombreux conseils, ainsi qu'au Dr P. Leuenberger qui a dirigé les essais histologiques.

Je remercie le professeur M. Van Ooteghem et le Dr G. Gamba qui ont accepté de faire partie du jury, de même que le professeur J. Tronchet pour avoir présenté cette thèse à la Faculté des sciences.

J'exprime toute ma gratitude à la maison Zyma SA à Nyon pour son appui scientifique et financier.

Enfin, je remercie Monsieur J.-P. Vuagniaux pour l'exécution des schémas et je sais gré à tous mes collègues du laboratoire de pharmacie galénique de leur soutien.

Jacques Barrelet

TABLE DES MATIERES

	Avant-propos	p.	1
I.	Biopharmacie et médicaments ophtalmiques		3
I.1	Introduction		3
I.2	Voies d'absorption, notions anatomiques et physiologiques		5
I.3	Evaluation biopharmaceutique		10
I.3.1	Méthodes "in vivo"		10
I.3.2	Méthodes "in vitro" sur la cornée isolée		11
I.4	Formulation		13
I.4.1	Propriétés du principe actif		13
I.4.2	pH, systèmes tampon, dissociation des molécules		15
I.4.3	Propriétés osmotiques des solutions		18
I.4.4	Adjuvants de fabrication		19
I.4.4.1	Adjuvants tensio-actifs		19
I.4.4.2	Adjuvants viscosifiants		20
I.5	Systèmes dispersés et formes galéniques semi-solides		22
I.6	Domaines de recherche en matière de perméabilité cornéenne		24
II.	Mise au point d'un modèle pour l'expérimentation sur la cornée isolée		30
II.1	Exigences physiologiques du tissu cornéen, réalisation "in vitro" des conditions requises		30
II.2	Description du modèle		35
II.2.1	Cellule et fixation de la cornée		35
II.2.2	Alimentation en milieu de perfusion		

II.2.3	Appareillage de contrôle	p.	40
II.2.3.1	Manomètres pour le milieu de perfusion et le mélange gazeux		41
II.2.3.2	Examen optique de la cornée et mesures d'épaisseur		41
II.2.3.3	Conductivimètre électrique		42
II.3	Caractéristiques du modèle en fonctionnement		43
II.3.1	Débit du milieu de perfusion		43
II.3.2	Conductivité électrique		45
II.3.3	Epaisseur cornéenne		46
II.3.4	Contrôle statistique de la reproductibilité des résultats		47
II.4	Examen histologique des tissus		52
II.5	Manipulations expérimentales		58
II.5.1	Prélèvement, préparation et montage de la cornée		58
II.5.2	Protocole expérimental		60
II.6	Conclusions		
III.	Application du modèle au transport de quelques principes actifs et influence de divers paramètres		66
III.1	Traitement des résultats expérimentaux: bases théoriques		66
III.1.1	Notion et modèle de transport		66
III.1.2	Aspect cinétique du transport		
III.1.3	Transport en présence d'adjuvants tensio-actifs et viscosifiants		72
III.2	Transport de la procaïne		74
III.2.1	Résultats et interprétation		76

III.2.1.1	Influence du pH et du traitement préalable de la cornée par la solution tampon	p. 77
III.2.1.2	Influence de la procaïne et du pH sur la conductivité électrique à travers la cornée et son épaisseur	80
III.2.1.3	Influence des tensio-actifs	83
III.2.1.4	Influence de la méthylcellulose	90
III.2.1.5	Influence des adjuvants sur la conductivité à travers la cornée et son épaisseur	91
III.3	Transport de l'éphédrine	97
III.4	Transport de l'oxyphenbutazone	100
III.5	Transport du Diclofénac	
III.5.1	Résultats des essais et interprétation	109
III.5.1.1	Influence de la concentration	111
III.5.1.2	Influence du pH	113
III.5.1.3	Influence du Tween ^R 80	114
III.5.1.4	Influence de l'hydroxypropylméthylcellulose 60 HG	115
III.5.1.5	Influence de la nature du tampon et du cation	117
III.5.1.6	Influence de la force ionique	118
III.5.1.7	Influence du Diclofénac et de la formulation sur la conductivité à travers la cornée et son épaisseur	120
IV.	Conclusions et résumé	126
	Bibliographie	130

A V A N T - P R O P O S

Les expériences que nous décrivons ont été réalisées dans l'intention de déterminer l'influence de divers facteurs sur le passage des médicaments à travers la cornée. Nous avons plus particulièrement développé l'aspect biopharmaceutique de la question, en considérant en premier lieu le rôle joué par la formulation dans la pénétration intra-oculaire du principe actif, sans pour autant négliger l'importance de sa structure et de ses caractéristiques propres.

La cornée et la conjonctive représentent les deux sites d'absorption des médicaments ophtalmiques en application externe. Nous nous intéressons exclusivement au premier.

A cette fin, nous avons mis au point un modèle et une méthode permettant l'expérimentation à l'aide d'un tissu prélevé sur le lapin, puis maintenu vivant et fonctionnel "in vitro", grâce à des conditions de nutrition, de pression et de température se rapprochant de celles rencontrées à l'état physiologique.

Nous avons été motivé, dans le choix de notre méthode de travail, par la spécificité au niveau cornéen dans l'étude du transport, difficile à obtenir "in vivo", par la possibilité d'effectuer aisément des prélèvements en vue de dosages, par celle de modifier, dans ses limites de tolérance, les conditions où se trouve le tissu et enfin, par l'élimination de tous les paramètres extérieurs à la cornée elle-même.

La méthode exposée ne prétend pas remplacer l'expérimentation sur l'animal ou les essais cliniques. Elle offre par rapport à eux un caractère complémentaire, permettant des essais systématiques, préalablement à d'autres expériences, ou, au contraire, l'explication à un niveau précis d'observations faites "in vivo".

Plusieurs modèles proches de celui que nous avons mis au point ont été construits, mais avant tout pour étudier la physiologie cornéenne et le transport de substances d'intérêt métabolique.

Le présent travail tente d'apporter une contribution à l'étude d'un domaine dont les aspects biopharmaceutiques sont encore peu explorés.

I. Biopharmacie et médicaments ophtalmiques

I.1 Introduction

La fragilité et l'importance de l'oeil font que les médicaments ophtalmiques doivent être préparés en tenant compte de tout ce qui peut améliorer leur qualité, leur efficacité et leur sécurité d'emploi. Leur développement biopharmaceutique constitue l'une des étapes essentielles de leur mise au point.

En ophtalmologie, dans le domaine de la perméabilité cornéenne aux médicaments, certains essais remontent déjà au siècle dernier¹. Ils ne sauraient constituer à eux seuls la base véritable d'une expérimentation moderne et réaliste. En effet, leurs résultats, comme l'interprétation qui en est donnée, restent encore très empiriques.

L'un des premiers travaux dont l'orientation se rapproche des préoccupations de la biopharmacie est celui de ANTONIBON², en 1929, concernant des mesures d'absorption par la cornée. Il recourt toutefois à des méthodes peu spécifiques et à des substances dépourvues d'intérêt thérapeutique ou biologique.

Le début d'une étude systématique du passage des médicaments à travers la cornée peut approximativement être situé aux travaux de SWAN ET WHITE³, dès 1942. Ces auteurs examinent les caractéristiques de transport de molécules d'une même série chimique, dont les substitutions, par leur nature et leur position, modifient la polarité et la solubilité; ils déterminent également dans quelle mesure les

adjuvants courants influent sur les phénomènes de transport.

Dès cette époque, les expériences se font plus fréquentes, envisageant l'influence des paramètres physico-chimiques⁴⁻⁷ et celle de tensio-actifs⁸⁻¹² ou de viscosifiants, en parallèle avec le développement de leur emploi en pharmacie.

MAURICE¹ présente, en 1953, une revue qui fait le point des connaissances acquises en matière de perméabilité cornéenne à l'époque de sa publication. Il rend compte de ses propres résultats expérimentaux qui mettent en valeur l'importance relative des différents tissus de la cornée.

Avec l'apparition de dispositifs permettant l'expérimentation "in vitro" sur la cornée isolée¹⁷⁻²⁰, les méthodes de recherche se diversifient, cependant que d'autres travaux, faisant appel à des techniques dont les composantes sont purement artificielles²¹⁻²⁴ (diffusion en gel, membranes synthétiques) sont réalisés.

La recherche ophtalmologique actuelle, dans le domaine qui nous intéresse, est orientée surtout vers ses implications physiologiques²⁵⁻²⁷, vers le transport de substances concernées par le métabolisme (eau, Na^+ , Ca^{++} , HCO_3^- , glucose, acides aminés)²⁸⁻³⁴ et vers l'étude des paramètres électriques (différence de potentiel, résistance)^{27, 33, 35-38}. L'expérimentation récente en biopharmacie des formes ophtalmiques ne comprend encore qu'un faible nombre de travaux et très peu d'études cinétiques des phénomènes de transport.

I.2 Voies d'absorption, notions anatomiques et physiologiques

Les préparations ophtalmiques en application externe sont résorbées par deux voies: la cornée⁴²⁻⁴⁶ et la conjonctive^{42,47-49}.

Plusieurs différences distinguent ces deux tissus, les deux principales étant l'absence, dans la cornée, de la vascularisation présente dans la conjonctive et le fait que la nutrition cornéenne est assurée par imbibition à partir des structures anatomiques adjacentes et des fluides intra et extra-oculaires, alors que celle de la conjonctive se fait par voie circulatoire.

La réalisation d'essais "in vitro" se trouve dès lors simplifiée, comparativement aux difficultés qu'entraînerait l'emploi d'un tissu vascularisé⁵⁰.

L'importance relative de ces deux voies d'absorption dépend fortement du principe actif lui-même, de ses propriétés pharmacologiques et physico-chimiques. Ainsi, compte tenu des différences existant entre la conjonctive et la cornée, les corticostéroïdes^{40,51}, fortement vasoconstricteurs, sont pour ainsi dire exclusivement absorbés par cette dernière. De même, les alcaloïdes myotiques ou mydriatiques d'emploi courant en ophtalmologie sont en grande partie transportés à travers la cornée^{39,52,55}.

Chez l'homme et chez certains animaux^{42,43}, comme le lapin, qui a servi à toutes nos expériences, la cornée présente une courbure plus prononcée que le reste du globe oculaire. Faiblement elliptique sur sa face

externe, elle est parfaitement circulaire du côté interne. Epaisse d'environ 0,53 mm chez l'homme, la cornée mesure en moyenne 0,40 mm chez le lapin. Plusieurs facteurs, tant externes que physiologiques, en particulier le degré d'hydratation⁴³, sont susceptibles de modifier cette épaisseur dont les changements sont un critère important de l'état des tissus⁴⁶, un gonflement se produisant dans les cas pathologiques. La réversibilité de ce phénomène permet de vérifier, tant qu'elle subsiste, que la cornée est vivante et fonctionnelle.

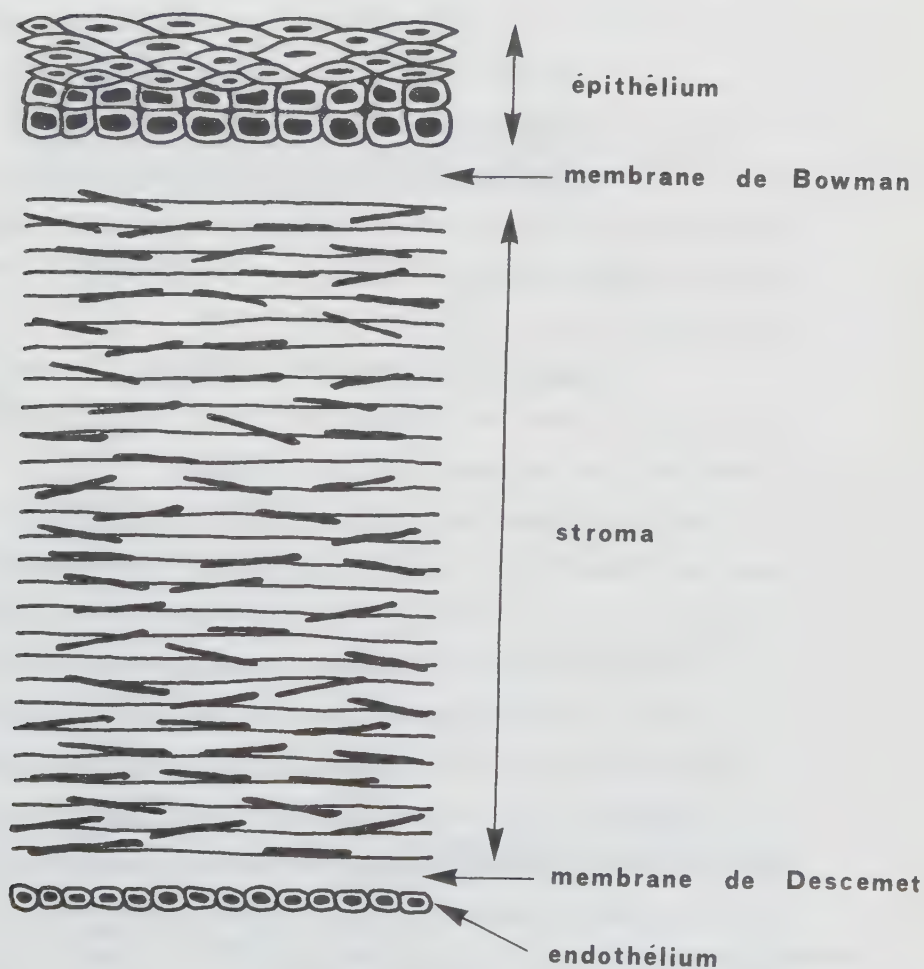
La cornée comprend une superposition de tissus dont la structure est très différenciée^{21,42,43,45} (Fig. 1).

L'épithélium⁵⁶ est le tissu le plus externe.

Formé de plusieurs couches de cellules, il représente environ un dixième de l'épaisseur cornéenne totale. De nature lipophile^{21,52,56}, facteur important du point de vue de sa perméabilité aux médicaments, il comprend, à partir de l'intérieur, des cellules basales en forme de colonnes, d'un diamètre de 10 μm , étroitement groupées; les couches moyennes sont formées de cellules au contour plus découpé, qui deviennent plus plates, s'amincissent puis s'élargissent jusqu'aux couches superficielles qui consistent en cellules squameuses, larges de 45 μm et se recouvrant partiellement⁴². L'épithélium représente la principale barrière opposée au passage des médicaments à travers la cornée. Sa perméabilité est près de 1700 fois inférieure à celle de l'endothélium¹, aussi est-elle pour ainsi dire comparable à celle de la cornée entière⁵⁷⁻⁶⁰.

Figure 1

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CORNEE



Le stroma et la zone ou membrane de Bowman

présentent, au contraire de l'épithélium, une structure hydrophile, aussi la molécule qui les traverse le fait-elle, s'il y a lieu, sous forme dissociée, comme le montre le schéma élaboré par KINSEY⁶¹ (Fig. 2). Le stroma occupe approximativement les neuf dixièmes de l'épaisseur cornéenne. Il est principalement composé de couches de collagène, les lamelles du stroma, disposées parallèlement les unes aux autres et dans lesquelles on note la présence de cellules dispersées. La portion antérieure du stroma forme la membrane de Bowman, épaisse de 12 μm et visible en microscopie optique après coloration appropriée.

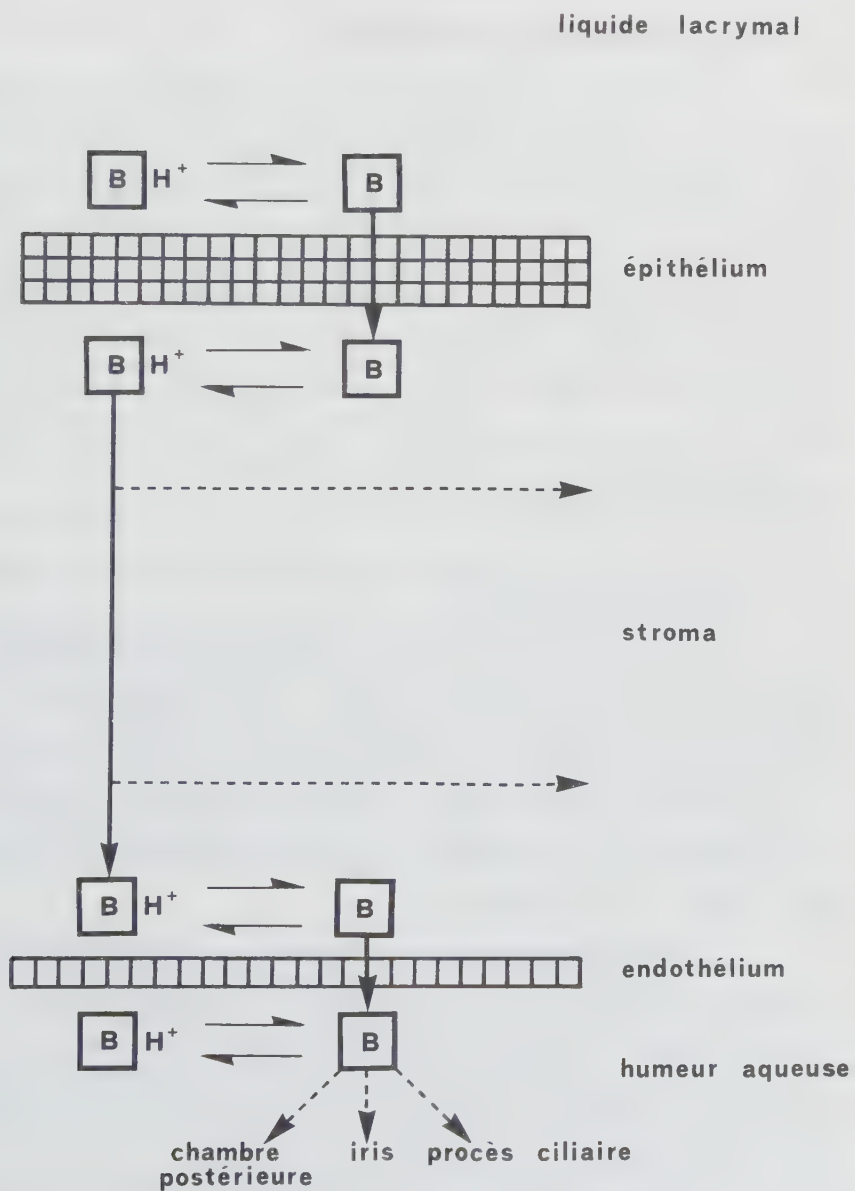
La membrane de Descemet, contiguë à la surface interne du stroma, est épaisse de 5 à 10 μm et présente une forme atypique de structure de collagène.

L'endothélium, tissu le plus interne de la cornée, est formé d'une seule couche de cellules épaisses d'environ 5 μm et larges de 20 μm . Comparées aux cellules de l'épithélium, celles de l'endothélium ont un cytoplasme plus riche en mitochondries et en inclusions diverses. L'endothélium présente, lui aussi, une structure lipophile. Il correspond à la surface externe de la chambre antérieure qui renferme l'humeur aqueuse, principal fluide intra-oculaire, à partir duquel sont distribués dans l'oeil les médicaments qui ont passé la cornée⁶².

L'épithélium de la conjonctive présente beaucoup de similitudes avec celui de la cornée. Les différences entre ces deux tissus se manifestent au niveau immédiatement sous-jacent de la conjonctive, hautement vascularisé,

Figure 2

TRANSPORT D'UNE BASE A TRAVERS LA CORNEE (D'APRES KINSEY⁶¹)



contrairement au stroma qui ne présente aucune structure de ce type.

I.3 Evaluation biopharmaceutique

L'étude biopharmaceutique des préparations ophtalmiques peut suivre différentes voies, en dehors des techniques de diffusion en gel ou en solution, à l'aide de membranes artificielles, que nous ne faisons que mentionner²²⁻²⁴. Nous nous intéressons ici aux méthodes recourant à l'animal vivant et à celles utilisant "in vitro" la cornée isolée. L'examen des caractéristiques de ces deux modes d'investigation montrera leurs avantages et leurs limites respectifs, de même que leur complémentarité.

I.3.1 Méthodes "in vivo"

Ces méthodes étudient la pénétration des médicaments dans les structures de l'oeil par l'ensemble des voies d'absorption (cornée et conjonctive)^{3-12,14-16,63}. Grâce à des dispositifs particuliers (verres de contact, cupules)⁵⁷, la cornée ou, plus rarement, la conjonctive seule⁶⁴ peuvent être prises en considération.

Pour les substances agissant sur la musculature ciliaire (myotiques et mydriatiques), on compare fréquemment l'intensité de l'effet de deux préparations par mesure du diamètre pupillaire, celui-ci étant en relation avec la quantité de médicament absorbée^{14,15}.

La fluorescéine, traceur le plus utilisé en ophtalmologie, est dosée par fluorimétrie directe^{65,66}. Plus ra-

res sont les mesures de concentration dans l'humeur aqueuse.

Lorsqu'il s'agit de doser le principe actif lui-même, on recourt souvent à une mesure de la baisse de sa concentration dans la forme galénique appliquée^{55,67}.

L'expérimentation "in vivo", en particulier celle sur l'ensemble des voies d'absorption, présente l'avantage d'envisager le transport du médicament dans les conditions réelles où il a lieu, c'est à dire en tenant compte du battement des paupières, augmenté à la suite de l'instillation d'un produit étranger dans le sac conjonctival et surtout du larmolement qui entraîne la plus grande partie de la préparation dans le canal naso-lacrymal.

En revanche, cette réalité des conditions est aléatoire sur le plan pratique⁴⁰, car elle ne donne qu'une image globale des phénomènes de transport. Elle implique, de plus, des prélèvements des fluides intra-oculaires difficiles et traumatisants pour les tissus. Enfin, elles se trouvent soumises à des fluctuations importantes, en raison des différences rencontrées d'un animal à l'autre (état physiologique, changements dans la composition des fluides, réactions variables à l'instillation de la préparation).

I.3.2 Méthodes "in vitro" sur la cornée isolée

L'étude du transport des médicaments à l'aide de modèles permettant "in vitro", de maintenir la cornée vivante et fonctionnelle implique quelques limitations, puisque le tissu se trouve séparé des structures qui l'environnent dans l'oeil entier et, dès lors, de substances entrant en jeu dans

sa nutrition et son métabolisme. De plus, il n'est guère possible de reconstituer "in vitro" la pellicule précornéenne, si bien que l'expérience a véritablement lieu au niveau de la cornée seule.

De nombreuses cellules^{18-20,69} pour l'étude "in vitro" des phénomènes de transport ont été développées en ophtalmologie comme dans d'autres domaines. La reproductibilité des résultats et des examens histologiques prouvent que des conditions expérimentales adéquates permettent de réduire les effets de ces limitations^{38,45,70}. L'expérimentation au moyen d'un modèle présente l'avantage d'offrir une grande similitude de conditions d'un essai à l'autre, la cornée n'étant pas dépendante de phénomènes physiologiques externes.

La composition connue et constante des solutions de perfusion^{38,71,72} permet de prévenir des problèmes d'incompatibilités et contribue à l'obtention de conditions standardisées, facilitant le traitement ultérieur des résultats. Enfin, les conditions expérimentales peuvent être modifiées dans les limites de pression et de débit en milieu de perfusion tolérables par les tissus⁷³. L'état de la cornée et son épaisseur sont contrôlés en continu pendant la durée de l'expérience. Une planification adéquate des essais doit permettre la mise en évidence de relations avec des mesures réalisées "in vivo"^{57,71}.

I.4 Formulation

L'état du tissu sur lequel on applique la préparation joue un rôle important dans le passage du médicament. Toute lésion, toute anomalie ou irrégularité de fonctionnement modifient les conditions d'absorption et excluent la reproductibilité de résultats expérimentaux. Le transport des médicaments à travers la cornée, compte tenu de ce qui précède, est conditionné à la fois par leur forme galénique³ et leurs propriétés physico-chimiques. En relation avec les caractéristiques du tissu cornéen et surtout de l'épithélium, que le médicament doit franchir avant de parvenir à son lieu de distribution, nous évoquerons les principales de ces propriétés.

Ce qui est vrai pour l'épithélium cornéen vaut également pour celui de la conjonctive⁴⁷⁻⁴⁹, la différence apparaissant à un niveau plus profond: le stroma non vascularisé ou le tissu sous-épithélial, très riche en vaisseaux.

I.4.1 Propriétés du principe actif

Le médicament proprement dit traversera les membranes biologiques dans une mesure qui sera fonction de sa structure chimique, de son poids, de ses dimensions moléculaires et de sa polarité.

Sa solubilité et son coefficient de partage vont avoir un rôle en relation avec le caractère lipophile de l'épithélium. Selon RITSCHEL⁷⁴, la valeur idéale du coefficient de partage pour le passage à travers la cornée serait approximativement de 1. Cette notion se trouve en accord

avec la description de la barrière cornéenne proposée par KINSEY⁶¹, montrant que le passage du médicament est optimal, au niveau épithélial, sous la forme non ionisée, au niveau du stroma, sous la forme dissociée et à travers l'endothélium, sous la forme non ionisée (Fig. 2).

L'épithélium, de par sa nature, est plus perméable aux substances faiblement dissociées. Cette propriété permet d'agir, par le choix d'une formulation adéquate, sur le transport du médicament, de l'augmenter ou de le réduire selon les nécessités thérapeutiques. Ainsi, la pénétration des alcaloïdes, qui sont des bases faibles, comme l'atropine, la pilocarpine ou l'éphédrine, est plus intense à un pH qui, dans les limites de tolérance de la cornée, tend vers l'alcalinité. Ces substances se trouvent alors faiblement dissociées⁷⁵.

L'existence d'une différence de potentiel de l'ordre de 40 mV à travers la cornée (pôle positif du côté endothélial, pôle négatif du côté épithélial) joue un rôle en relation avec la polarité des molécules médicamenteuses. Il s'agit de processus complexes dépendant de la physiologie et du métabolisme. Ils ont été étudiés de manière approfondie pour les électrolytes^{17,64}, mais n'ont guère fait l'objet d'essais pour les médicaments dont on a plutôt déterminé l'influence sur le potentiel¹⁹.

La concentration représente un élément important, du fait que la plupart des médicaments sont transportés par diffusion passive. La vitesse de ce processus est, dès lors, fonction du gradient de concentration à travers la cornée.

De nombreux exemples expérimentaux viennent à l'appui de cette constatation^{54,55,76-81}.

I.4.2 pH, systèmes tampon, dissociation des molécules

Trois raisons font du pH un élément important dans la formulation des préparations ophtalmiques:

- tolérance de l'oeil à des limites définies de pH
- influence sur la proportion de forme ionisée^{3,7,75}
- influence sur la stabilité des principes actifs.

Les pharmacopées fixent des limites de pH pour les préparations ophtalmiques. Elles recommandent d'éviter l'emploi de solutions tamponnées⁵² en dehors de ces normes pour la conservation de la préparation, si le principe actif oblige au choix d'un pH situé en deçà ou au delà de ces limites. Il convient de trouver le meilleur compromis entre stabilité, tolérance et efficacité. Les considérations pratiques obligent souvent à tenir compte du premier de ces trois critères en priorité.

HIND ET GOYAN⁷⁵ ainsi que d'autres auteurs⁸²⁻⁸⁴ ont étudié la question des solutions tampon, en relation avec les médicaments qui s'y trouvent dissous et leur tonicité. Ils précisent les meilleures conditions de formulation pour les principes actifs couramment utilisés en ophtalmologie.

Pour un acide ou une base, à une valeur de pH définie, le degré d'ionisation est calculé d'après les équations suivantes:

$$a_a = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (1)$$

$$a_b = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (2)$$

Les fractions non ionisées sont données par:

$$1 - a_a = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (3)$$

$$1 - a_b = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (4)$$

a_a augmentant et a_b diminuant, pour des valeurs croissantes de pH.

L'aptitude du médicament à passer la barrière cornéenne dépend du pK_a et du pH, ainsi que l'expriment les équations de Henderson-Hasselbach:

$$\text{- pour un acide: } pK_a = pH + \log \frac{c_u}{c_i} \quad (5)$$

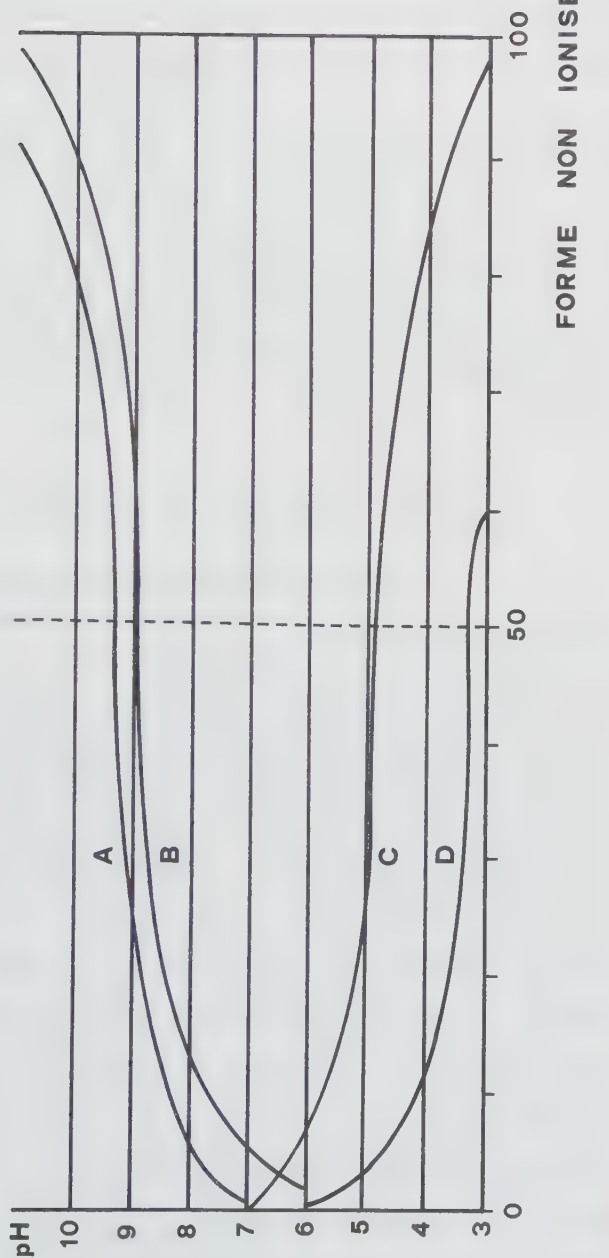
$$\text{- pour une base: } pK_a = pH + \log \frac{c_i}{c_u} \quad (6)$$

où c_u exprime la concentration molaire en molécules non ionisées et c_i celle en molécules ionisées. La Fig. 3 montre cette relation pour les produits utilisés dans nos essais.

Figure 3

PROPORTION DE FORME NON IONISEE, EN FONCTION DU pH, DES MEDICAMENTS ETUDIES

A éphédrine C oxyphenbutazone
B procaïne D Diclofénac



Certains types de solutions favorisent le passage des médicaments, en relation avec leur degré de compatibilité pour les milieux biologiques. L'ion potassium peut, au contraire, exercer un effet frénateur, ce qui a été démontré pour d'autres membranes (intestin du rat)⁸⁶. Enfin, il a été prouvé qu'on pouvait notablement augmenter le passage de certains médicaments après traitement de l'oeil par une solution tamponnée⁸⁷⁻⁸⁹ qui, en modifiant le pH du milieu lacrymal, favorisera le passage ultérieur du principe actif.

I.4.3 Propriétés osmotiques des solutions

L'isotonicité aux larmes n'est pas toujours une nécessité absolue pour les solutions ophtalmiques appliquées à l'oeil sain²¹. Elle représente, en revanche, une condition indispensable pour l'oeil blessé ou opéré. TROLLE-LASSEN⁹⁰, cité par COWLE ET ANDERSON⁸³, a montré que des concentrations en chlorure de sodium entre 0,7 et 1,4 % étaient tolérées sans douleur et sans effet irritant pour l'oeil. FENTON⁶ a étudié le problème en ce qui concerne la sulfacétamide. MUNZEL⁵² examine de ce point de vue les médicaments d'emploi fréquent en ophtalmologie. Les solutions hypertoniques sont en général mieux supportées et entraînent moins de dommages pour le tissu cornéen que si elles sont hypotoniques. MAURICE⁷ a étudié les effets de la tonicité des solutions sur la perméabilité cornéenne. Il constate "in vivo" que cette perméabilité augmente en présence d'une solution hypotonique, cependant que l'hypertonycité est sans effet, ou, à la limite,

exerce une légère diminution.

I.4.4 Adjuvants de fabrication

En plus du choix d'une concentration optimale en principe actif, de celui d'un pH convenable et d'une solution tampon adaptée aux nécessités que nous avons décrites plus haut, on recourt très fréquemment à des adjuvants modifiant la viscosité ou la tension superficielle des solutions, pour agir sur leur miscibilité aux sécrétions lacrymales, ainsi que sur la libération et la vitesse de transport des médicaments.

I.4.4.1 Adjuvants tensio-actifs^{7-13,91}

Les substances tensio-actives ajoutées aux préparations ophtalmiques remplissent plusieurs fonctions. En plus de l'activité anti-microbienne de produits cationiques comme le chlorure de benzalkonium ou le chlorure de cetylpyridinium, l'abaissement de la tension superficielle entraîne des effets favorables à l'action thérapeutique de la préparation. La miscibilité des solutions avec la pellicule lacrymale de même que leur étalement à la surface de la cornée et de la conjonctive se trouvent favorisées, contribuant ainsi à améliorer pénétration et absorption. De plus, les tensio-actifs agissent directement sur l'épithélium cornéen en diminuant l'importance de la barrière opposée au passage des médicaments^{65,92,93}. La nature de cette barrière, malgré son intérêt, n'est pas encore complètement élucidée. Elle a été décrite, chez le lapin, comme une double membrane lipidique de structure homogène et continue,

recouvrant également les jonctions cellulaires et serait le principal obstacle s'opposant au passage des médicaments.

Les tensio-actifs ne doivent pas être irritants ou toxiques pour la cornée. Or, les plus efficaces pour augmenter l'absorption sont précisément les plus agressifs pour les tissus. Les produits cationiques et non ioniques sont couramment utilisés en ophtalmologie, ces derniers étant les mieux tolérés.

L'influence de la notion de HLB a été étudiée par MARSH ET MAURICE⁶⁵ qui ont constaté une pénétration optimale de la fluorescéine avec un système Tween^R 20 - Brij^R 35, fournissant une valeur HLB de 16 - 17. Ils confirment les résultats d'expériences précédentes, en constatant que le Tween^R 20 est l'un des meilleurs tensio-actifs non ioniques pour accroître la pénétration de médicaments, comme l'ont montré leurs essais sur l'homme.

Il convient de tenir compte de la concentration micellaire en tensio-actif, car seule la partie libre du médicament, non solubilisée dans les micelles, est à même de franchir la barrière cornéenne. Enfin, il ne faut pas négliger la possibilité d'interactions entre tensio-actifs et médicaments, qu'il s'agisse de formation de complexes⁹⁴ ou de phénomènes d'autre nature.

I.4.4.2 Adjuvants viscosifiants

Seul un nombre réduit d'adjuvants viscosifiants convient à l'emploi en ophtalmologie⁵⁶. Les principaux produits utilisables sont les dérivés cellulosiques:

méthylcellulose, hydroxypropylméthylcellulose et carboxyméthylcellulose, les polyéthylèneglycols et l'alcool polyvinylique. Ces substances permettent la préparation de gels dont la transparence, l'indice de réfraction et l'absence de toxicité autorisent l'application à l'oeil.

L'emploi de viscosifiants est destiné à augmenter le temps de contact entre la préparation et la cornée¹³⁻¹⁵, pour accroître ou prolonger la réponse thérapeutique. La présence de macromolécules est néanmoins susceptible de ralentir le passage à travers les barrières biologiques. Il convient donc de s'assurer que le bilan est positif et que l'augmentation du transport due au contact prolongé est plus importante que l'effet inhibiteur. Parmi de nombreux exemples, nous pouvons citer l'augmentation de la mydriase par l'adjonction de méthylcellulose à un collyre d'homatropine¹⁴ ou celle du myosis par adjonction de la même substance à un collyre de pilocarpine^{15,96}.

Cette action sur la libération du médicament n'est pas uniquement obtenue au moyen de viscosifiants. Il est également fait appel à des systèmes tels que lentilles de contact²¹, insertions de matière synthétique ou pellicules de collagène résorbable⁹⁷ imprégnées de principe actif. En plus des problèmes de tolérance et des considérations d'ordre thérapeutique, ce sont le plus souvent les exigences technologiques qui motivent le choix d'un viscosifiant. Les interactions médicament-viscosifiant peuvent être du même ordre que celles rencontrées avec les tensio-actifs (formation de complexes)⁹³.

I.5 Systèmes dispersés liquides et formes galéniques semi-solides²¹

Certains principes actifs insolubles sont formulés en suspension^{98,99}; ces préparations doivent répondre à des normes sévères en matière de dimension et de forme des particules, en raison de l'abrasion qu'elles peuvent provoquer. Les corticostéroïdes sont le type de médicament le plus souvent présenté sous forme de suspension, bien qu'il en existe des formes solubles. Il y a à cela deux raisons principales: les sels sodiques des corticoïdes donnent des solutions alcalines et, sous cette forme, ils se trouvent fortement dissociés, ce qui rend leur absorption plus faible que si l'on emploie la forme insoluble dans une suspension où son ionisation est insignifiante.

HULL⁴⁰ a montré, dans des expériences "in vitro" avec ces produits, toute l'importance de l'épithélium dans l'absorption des dérivés hydrosolubles; il constate que le passage est considérablement augmenté à travers une cornée sans épithélium, alors que le changement n'est pas significatif, dans les mêmes conditions, pour une forme liposoluble. Ceci souligne également le caractère hydrophile du stroma. D'autres essais ont montré, "in vivo", le comportement des corticoïdes face à la barrière cornéenne^{51,104}.

Les formes galéniques semi-solides, principalement les pommades, montrent par rapport aux collyres une plus longue durée d'action. Elles forment sur la cornée une pellicule susceptible de brouiller la vue et de gêner la régénération épithéliale.

La formulation des pommades ophtalmiques²¹ pose des problèmes différents de celle de la même forme pour la dermatologie. Cette différence résulte de ce que la nature des tissus d'application n'est pas la même et des caractéristiques physiques de ce type de médicaments. Les pommades ophtalmiques doivent s'étaler de manière homogène à la surface de la cornée et du sac conjonctival. Il faut pour cela qu'elles possèdent des propriétés rhéologiques optimales, déterminées expérimentalement⁹⁹. Elles doivent fondre à la température de la surface de l'oeil (environ 33°C)¹⁰⁰ et présenter des caractéristiques hydrophiles, de manière à se mélanger avec le liquide lacrymal ou à former une émulsion avec celui-ci.

Les médicaments contenus dans ces pommades s'y trouvent soit à l'état dissous, soit sous forme de suspension. Cette différence physique joue un rôle moins marqué que dans les préparations destinées à l'usage cutané, car l'action mécanique des paupières contribue au processus de libération. En revanche, la capacité d'étalement de la pommade et sa faculté d'adhérer aux tissus influenceront la pénétration du principe actif. Tout comme pour les suspensions fluides, la taille des particules agit sur le passage du médicament, donc sur son effet thérapeutique.

Les lois régissant la diffusion du médicament dans l'excipient sont les mêmes que celles valables pour les pommades en général.

On a par exemple, selon HIGUCHI¹⁰¹, pour les pommades où le principe actif est en suspension:

$$Q = \sqrt{2 \cdot C_A \cdot D \cdot C_S \cdot t} \quad (7)$$

où: Q = quantité de médicament libérée
 C_A = concentration en particules non dissoutes
 C_S = concentration de saturation de la phase externe par les particules dissoutes
 D = coefficient de diffusion du principe actif dans la phase externe
 t = temps d'application

MUELLER¹⁰² a décrit une méthode de calcul du coefficient de diffusion pour une base donnée.

Enfin, les méthodes pour tester la libération des médicaments à partir des pommades ophtalmiques²¹ sont les mêmes que celles employées pour les solutions ou les gels, qu'elles soient pratiquées "in vivo" ou "in vitro", sur des tissus vivants ou sur des supports artificiels.

I.6 Domaines de recherche en matière de perméabilité cornéenne

La plus grande partie de l'éventail des médicaments utilisés en thérapeutique ophtalmologique, comme les substances myotiques, mydriatiques ou anesthésiques et les agents chimiothérapeutiques a donné lieu à des essais relatifs à leur passage à travers la cornée et à la variation de paramètres qui lui sont liés. Ces essais ont, le plus souvent, été réalisés sur l'animal vivant, la part de l'expérimentation "in vitro" demeurant modeste. Le tableau 1 fournit un aperçu des travaux consacrés à ces problèmes.

Sélection de références intéressant la biopharmacie des médicaments ophtalmiques

Médicament ou substance	Facteurs et paramètres étudiés, méthode	Références
HCl, NaOH, I ₂	Perméabilité cornéenne, "in vivo"	ANTONIBON ² (1929)
Na ⁺ , H ₂ O, gaz, substances lipophiles	Perméabilité épithéliale et endothéliale en relation avec la structure des tissus, revue, "in vivo"	MAURICE ¹ (1953)
H ₂ O	Perméabilité épithéliale et endothéliale, "in vitro"	MISHIMA ET COLL. ⁵⁷ (1967)
excipients	Influence de la composition du véhicule sur la réponse au médicament, "in vivo"	SOEHRING ET COLL. ⁴ (1959)
excipients	Mode de pénétration des médicaments et formulation des collyres	MUNZEL ⁵² (1961)
chloramphénicol	Pénétration dans l'humeur aqueuse à partir d'une pommade et d'une solution, "in vivo"	HONEGGER ⁵ (1961)
sulfacétamide	Effet du pH et de la tonicité, "in vivo"	FENTON ⁶ (1951)
Na ⁺ , H ₂ O	Influence du pH et de la tonicité sur la perméabilité cornéenne, "in vivo"	MAURICE ET COLL. ⁷ (1955)

Médicament ou substance	Facteurs et paramètres étudiés, méthode	Références
stéroïdes	Absorption systémique après application topique, "in vivo"	BURCH ET COLL. ¹⁰³ (1968)
corticostéroïdes	Effets systémiques après application locale, "in vivo"	NURSALL ¹⁰⁴ (1965)
dexaméthasone Na	Absorption oculaire, "in vivo"	ROSENBLUM ¹⁰⁵ (1967)
cortisol	Pénétration dans l'oeil normal et pathologique, "in vivo"	JANES ¹⁰⁶ (1963)
cortisone	Pénétration dans l'humeur aqueuse, "in vivo"	DE BERNARDINIS ET COLL. ¹⁰⁷ (1953)
divers	Rôle du pH et des tampons dans les solutions ophtalmiques	HIND ET COLL. ⁷⁵ (1947)
cortisone	Pénétration dans les structures de l'oeil, "in vivo"	HAMASINGE ⁵¹ (1955)
divers	Effets des médicaments sur l'oeil	POITTS ¹⁰⁸ (1965)
fluorescéine	Effet du véhicule sur la pénétration intra-oculaire	ADLER ET COLL. ¹⁶ (1971)
divers	Pharmacologie et toxicologie de la cornée	SWAN ¹⁰⁹ (1949)

Médicament ou substance	Facteurs et paramètres étudiés, méthode	Références
pilocarpine, atropine, néostigmine, TEP	Influence sur l'impédance cornéenne, "in vitro"	BABBOTT ¹⁹ (1959)
sulfathiazole	Propriétés du médicament appliqué à l'oeil	LEOPOLD ¹¹⁰ (1943)
¹⁹⁹ Tc	Format des gouttes et dosage initial des préparations ophtalmiques topiques	CHRAI ET COLL. ¹¹³ (1974)
pilocarpine	Pellicules de collagène comme véhicule pour les médicaments ophtalmiques	RUBIN ET COLL. ⁹⁷ (1973)
tropicamide	Etude de l'absorption d'après les données pharmacologiques	SMOLEN ET COLL. ¹¹⁴ (1974)
prednisolone PO ₄	Pénétration dans et à travers la cornée, "in vivo"	GREEN ET COLL. ¹¹⁵ (1974)
pilocarpine	Transport à travers la cornée isolée	KROHN ET COLL. ³⁹ (1974)
corticostéroïdes solubles et insolubles	Etude "in vitro" du transport, préparations avec et sans épithélium	HULL ET COLL. ⁴⁰ (1974)

Médicament ou substance	Facteurs et paramètres étudiés, méthode	Références
pilocarpine	Rôle de la cornée dans la réponse biologique au médicament	VAN HOOSE ET COLL. ⁵³ (1974)
fluorescéine	Facteurs influençant son passage à travers la cornée	BESWICK ¹¹¹ (1958)
pilocarpine	Pénétration intra-oculaire chez les primates	ASSEFF ET COLL. ¹¹⁶ (1973)
fluorescéine	Augmentation de la pénétration grâce à des lentilles de contact hydrophiles	WALTMAN ET COLL. ¹¹⁷ (1970)
pilocarpine	Effet de l'anesthésie de surface sur la biodisponibilité	PATTON ET COLL. ¹¹⁸ (1975)
divers	Absorption cornéenne des médicaments ophtalmiques	LEE ET COLL. ⁵⁴ (1974)
divers	Médicaments ophtalmiques, gouttes ou pomades	--- ¹¹⁹ (1973)
divers, excipients	Revue sur la perméabilité cornéenne aux médicaments	BENSON ⁵⁵ (1974)
alcaloïdes, anesthésiques	Tampons augmentant la réponse pharmacologique	BOBERG-ANS ET COLL. ⁸⁸ (1959)

T a b l e a u 1 (suite)

Médicament ou substance	Facteurs et paramètres étudiés, méthode	Références
procaïne	Modèle pour l'étude du transport, "in vitro"	BARRELET ET COLL. ⁴¹ (1975)
acides naphthyl- aminesulfoniques et tensio-actifs	Facteurs agissant sur la perméabilité cornéenne, "in vivo"	SWAN ET COLL. ³ (1942)
tensio-actifs	Tensio-actifs en ophtalmologie	FELDMAN ET COLL. ¹² (1948)
méthylcellulose	Emploi en ophtalmologie	SWAN ¹³ (1945)
méthylcellulose	Effet sur la pénétration de l'homatropine	MUELLER ET COLL. ¹⁴ (1956)
méthylcellulose	Effet sur la réponse à la pilocarpine	HAAS ET COLL. ¹⁵ (1962)
tensio-actifs non ioniques	Effet sur la perméabilité à la fluores- céine	MARSH ET COLL. ⁶⁵ (1971)
détergents	Action sur l'oeil	GINSBURG ET COLL. ¹²⁰ (1949)
détergents	Action sur la pénétration de la sulfacé- tamide	GINSBURG ET COLL. ¹²¹ (1945)
agents mouillants	Réactivité des tissus oculaires	SWAN ⁹ (1944)

II. Mise au point d'un modèle pour l'expérimentation sur la cornée isolée

II.1 Exigences physiologiques du tissu cornéen, réalisation "in vitro" des conditions requises

Dans la cornée se déroulent des phénomènes métaboliques; l'énergie que requiert l'accomplissement de ces processus provient d'une nutrition essentiellement assurée à partir des deux faces du tissu, en raison de l'absence de vascularisation^{42,43}.

L'apport nutritif a lieu par trois voies:

- 1) Diffusion au niveau du limbe (jonction entre sclérotique et cornée) renfermant un réseau de capillaires (voie mineure)
- 2) Passage à travers l'épithélium à partir des larmes
- 3) Passage à travers l'endothélium depuis l'humeur aqueuse.

Pour la plupart des substances, seules ces deux dernières voies entrent véritablement en considération. On ne constate, en effet, qu'une diffusion insignifiante à travers le stroma vers la partie centrale de la cornée, à partir de la jonction cornéo-sclérale. Les substances diffusent lentement à partir du limbe et se trouvent exposées à des gradients de concentration élevés entre le stroma et l'humeur aqueuse d'une part, entre le stroma et les larmes d'autre part. En revanche, pour des substances de poids moléculaire élevé, comme les protéines plasmatiques, la

diffusion vers ces deux fluides est limitée. Ce n'est que dans ce cas que l'on peut noter un apport significatif par la voie du limbe, ce qui explique la présence dans la cornée de ces protéines, de même que celle de certaines enzymes de poids moléculaire comparable.

Les besoins métaboliques principaux sont ceux en oxygène, en glucose et en électrolytes, le calcium en particulier. Celui-ci joue un rôle important, comme l'ont montré des expériences "in vitro" sur les désordres créés par l'absence de Ca^{++} dans le milieu nutritif et leur réversibilité lors de l'adjonction de cet élément^{72,122}.

L'apport en glucose a lieu essentiellement à partir de l'humeur aqueuse et accessoirement à partir des larmes. Le rôle de celles-ci est moins important, selon GIARDINI ET ROBERTS¹²³, du fait de leur teneur réduite en glucose et de la perméabilité limitée de l'épithélium.

L'importance de l'humeur aqueuse comme source nutritive et celle de l'endothélium ont été démontrées par des expériences consistant à insérer des lamelles de matière plastique entre les tissus de la cornée. Cette opération conduit à la dégénérescence de la partie située au-dessus de l'insertion¹²⁴.

L'épithélium tire de l'atmosphère l'oxygène qu'il consomme. Dans des conditions normales, la cornée ne respire pas au maximum de sa capacité. En effet, la substitution d'oxygène pur à l'atmosphère abaisse le taux d'acide lactique dans les tissus¹²⁵, ce qui traduit une consommation incomplète de cet apport gazeux.

L'endothélium trouve dans l'humeur aqueuse l'oxygène qui lui est nécessaire¹²⁶.

T a b l e a u 2

Teneurs comparées en constituants non colloïdaux dans le plasma et l'humeur aqueuse du lapin (d'après DAVSON ⁴²)		
Constituant	Plasma (mmol/kgH ₂ O)	Humeur aqueuse (mmol/kgH ₂ O)
Na ⁺	151,50	143,50
K ⁺	5,50	5,25
Ca ⁺⁺	2,60	1,70
Mg ⁺⁺	1,00	0,78
Cl ⁻	108,00	109,50
HCO ₃ ⁻	27,40	33,60
Pouvoir réducteur exprimé en glucose	8,30	6,90

Une teneur plus faible en protéines distingue l'humeur aqueuse du plasma⁴². Elle contient cependant les mêmes constituants non colloïdaux, en particulier électrolytiques: Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ par exemple; selon DUKE-ELDER, cité par DAVSON⁴², l'humeur aqueuse serait un filtrat de plasma. Cette hypothèse a, par la suite, été revue au niveau de certains constituants, le chlorure de sodium en particulier¹⁴³.

L'humeur aqueuse mélangée des chambres antérieure et postérieure, dont le pH est d'environ 7,50, présente une légère hyperosmolarité par rapport au plasma. Des différences de composition existent entre le contenu des deux chambres⁶².

Enfin, la pression intra-oculaire joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité mécanique du tissu et de la différence de potentiel à travers celui-ci, de même que sur sa perméabilité. Les valeurs de pression intra-oculaire se situent, chez l'homme, entre 10,5 et 20,5 mmHg. Chez le lapin, elles sont de l'ordre de 16 à 20 mmHg.

L'épaisseur cornéenne est un critère déterminant de l'intégrité du tissu^{18,26,45,71,131,132}. Toute augmentation importante représente un signe pathologique qui, tant qu'il demeure réversible, caractérise le maintien des fonctions métaboliques de la cornée⁴³. Les phénomènes liés au gonflement peuvent se résumer ainsi: une cornée excisée, placée dans une solution physiologique, absorbe des sels et de l'eau en une quantité qui ne varie pas sous l'effet de la suppression de l'épithélium. Il devient dès lors évident que c'est une hydratation du stroma que l'on observe, celui-ci se comportant, au sens de la chimie des colloïdes, comme un gel. Tout comme ceux-ci, la cornée montre une pression de gonflement mesurable, qui diminue au fur et à mesure qu'elle absorbe de l'eau.

L'épithélium et l'endothélium séparent le stroma, structuré en gel, des fluides à partir desquels il peut absorber de l'eau. La tendance au gonflement doit donc

être contrecarrée par des processus actifs^{1,131}. Ceux-ci ont été abondamment étudiés et le rôle des couches limitantes a été mis en évidence^{14,26,131-134}. Ainsi, une cornée excisée, laissée à 4°C, gonfle au bout de quelque temps. Le retour à l'épaisseur normale peut être obtenu en plaçant le tissu dans une chambre humide à 31°C, jusqu'à élimination, par les cellules des structures limitantes, de l'eau et des sels qui avaient imprégné le stroma à basse température. HARRIS ET NORDQUIST¹³⁴ ont montré que cet effet (temperature reversal) se produit même en l'absence d'épithélium. Ils en tirent la conclusion que l'essentiel du mécanisme éliminant les fluides qui ont pénétré dans la cornée se situe au niveau endothélial^{136,137}. Cette évidence a encore été démontrée par GREEN ET OTORI²⁶ qui ont observé le rapide gonflement d'une cornée privée d'endothélium, alors qu'un tissu intact pouvait garder durant plusieurs heures son épaisseur normale, pour autant que le milieu contînt du glucose.

Dans les expériences "in vitro" réalisées par différents auteurs, une grande variété de milieux d'incubation a été employée. DONN ET COLL.¹⁸ se servent d'une solution de Krebs-Ringer bicarbonatée. EHLERS²⁰ en fait de même. MISHIMA ET COLL.^{57,71} travaillent avec ces milieux beaucoup plus complexes, du type de ceux propres à la microbiologie. MC CAREY ET COLL.²⁷ utilisent une solution de Ringer à base de glutathion. GREEN ET COLL.²⁶ ont mis en évidence le rôle du glucose. D'autres auteurs ont eu recours à des variantes de ces milieux de base^{31,72,127}.

II.2 Description du modèle

Sur la base des données qui précèdent, nous avons tenté de réaliser la meilleure approche possible des conditions où se trouvent les tissus cornéens dans leur environnement naturel. Il paraît exclu de recréer artificiellement un certain nombre d'éléments externes, en particulier le battement des paupières, à cause de l'extrême fragilité de la surface cornéenne et de l'absence de la pellicule pré-cornéenne permettant la lubrification indispensable. Pourtant, ce mouvement des paupières contribue beaucoup à l'absorption des médicaments et à leur évacuation par le canal naso-lacrymal. A notre connaissance, un seul essai⁴⁰ a été fait pour mettre au point un système imitant le flux lacrymal.

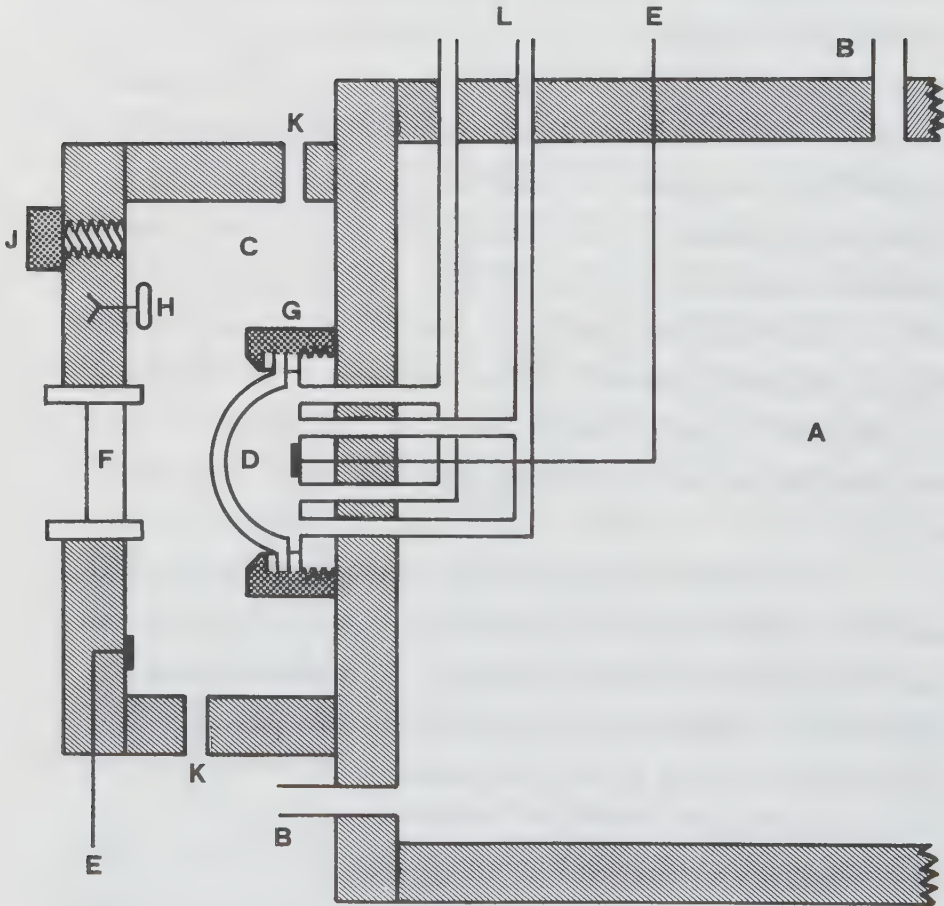
La plupart des modèles de conception récente sont composés de deux chambres, généralement en plexiglas, séparées par la cornée. L'apport nutritif et les conditions nécessaires à l'intégrité du tissu sont réalisées de manières très diverses, selon le but des essais^{18,20,25,28,29,57,71}.

II.2.1 Cellule et fixation de la cornée

La partie principale du dispositif consiste en une cellule comprenant un système de fixation de la cornée. Ce dernier joue un rôle primordial par son étanchéité qui, seule, assure des résultats portant sur la quantité réelle de médicament qui a passé la cornée. La cellule (Fig. 4) comprend deux chambres séparées par la cornée. La chambre

Figure 4

SCHEMA DE LA CELLULE



- | | | | |
|---|--|---|--|
| A | enceinte thermostatée | G | bague de fixation |
| B | orifices d'entrée et de sortie de l'eau de thermostatisation | H | agitateur magnétique |
| C | chambre supérieure | J | orifice de remplissage |
| D | chambre inférieure | K | orifices d'entrée et de sortie de la chambre supérieure |
| E | électrodes | L | alimentation de la chambre inférieure en milieu de perfusion |
| F | fenêtre de verre optique | | |

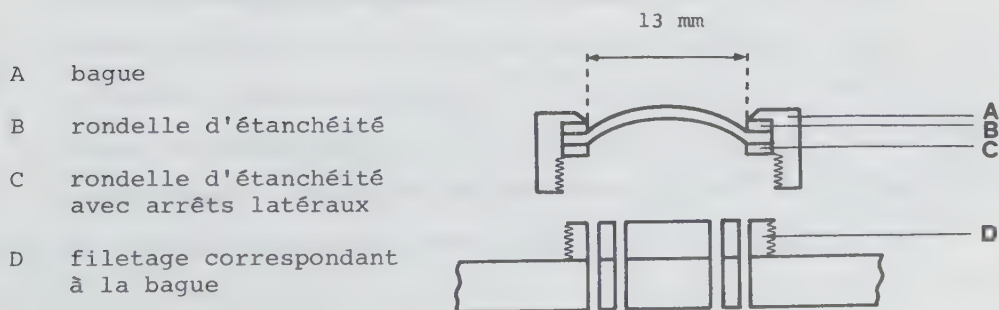
inférieure, d'un volume de $1,10 \pm 0,05$ ml, est limitée par l'endothélium cornéen et le fond du dispositif de fixation. Elle figure la chambre antérieure de l'oeil, dans laquelle est établie une circulation d'humeur aqueuse artificielle où sera dosé le principe actif ayant passé la cornée.

Du côté épithélial se trouve la chambre supérieure, d'un volume de 36 ml (15X40X60 mm). On y introduit les préparations à tester. Elle est fermée par un couvercle muni de quatre vis, dans lequel, face au côté épithélial de la cornée, est ménagée une fenêtre de verre optique. A travers celle-ci, on peut examiner le tissu au moyen d'une lampe à fente et mesurer son épaisseur. Un orifice, muni d'un bouchon vissé, est destiné au remplissage de la chambre supérieure avec la préparation médicamenteuse. Un agitateur magnétique, fixé dans le couvercle, permet d'assurer l'homogénéité des préparations dont la phase interne tend à sédimenter.

La cornée elle-même est placée entre deux rondelles de plexiglas, dont l'une est munie d'ergots latéraux, à l'intérieur d'une bague qui se visse sur le filetage correspondant de la cellule (Fig. 5).

Figure 5

SYSTEME DE FIXATION DE LA CORNEE



Le tissu ne subit ainsi qu'une pression verticale, sans distorsion, ce qui évite son glissement hors du dispositif.

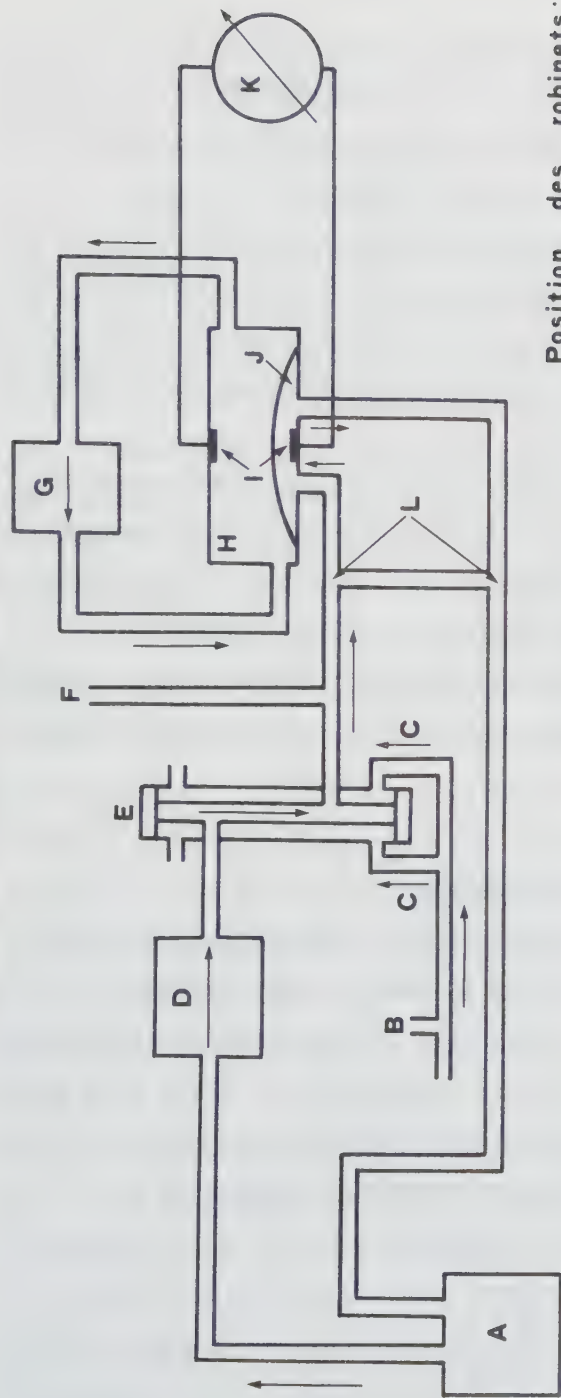
Deux électrodes d'argent, l'une placée dans le couvercle, l'autre au fond de la chambre inférieure, permettent les mesures de conductivité électrique à travers la cornée.

L'ensemble du système repose sur une enceinte thermostatée de 576 ml.

II.2.2 Alimentation en milieu de perfusion

La solution nutritive est contenue dans un bécher de 30 ml à double paroi et maintenue à température constante par le passage de l'eau qui thermostatise la cellule (Fig. 6). Le milieu est aspiré à l'aide d'une pompe péristaltique (ISMATEC mp-4) et envoyé dans un oxygénateur à membranes de silicone (ESCHWEILER). Celui-ci assure une saturation rapide de la solution en mélange gazeux, grâce à la grande surface de contact liquide-gaz (700 cm^2). Le milieu est traité par un mélange de 95 % O_2 + 5 % CO_2 . La présence du CO_2 ramène et maintient à 7,38 le pH de la solution, originellement alcaline. Une fois oxygénée, la solution passe dans un manomètre à eau qui indique la pression dans le circuit. Elle gagne ensuite la chambre inférieure qu'elle quitte soit pour retourner au réservoir de départ (circuit fermé), soit pour aboutir à un autre récipient (circuit ouvert). On peut recourir à cette deuxième possibilité pour prévenir la contamination des membranes de l'oxygénateur par des produits qui s'y adsorberaient. Avant le début de nos

SCHEMA DES CIRCUITS D'ALIMENTATION



- A réservoir de milieu nutritif
- B manomètre à mercure
- C mélange gazeux
- D pompe d'alimentation
- E oxygénateur
- F manomètre à eau
- G pompe de circulation pour la chambre supérieure
- H chambre supérieure
- I électrodes
- J chambre inférieure
- K conductivimètre
- L robinets à trois voies

Position des robinets:



Expérience en cours



Préchauffage et oxygénation du milieu

expériences, nous avons vérifié, pour les produits utilisés, l'absence de ce phénomène, en nous servant de fragments de membrane fournis par le constructeur.

La pression, du côté endothélial de la cornée, est réglée par une vis agissant sur le circuit de retour. Dans la presque totalité des essais effectués, nous avons employé une pression correspondant à celle existant dans l'oeil du lapin: $20,0 \pm 0,5$ mmHg.

Une liaison entre les circuits d'entrée et de sortie permet de faire circuler le milieu sans passage par la cellule, pour le tempérer et l'oxygéner, avant le montage de la cornée et le début effectif de l'expérience.

Il est également possible d'établir une circulation, mais sans oxygénation, pour le contenu de la chambre supérieure.

II.2.3 Appareillage de contrôle

Différents dispositifs permettent un contrôle en continu des conditions de l'expérience en cours. Il est dès lors possible de connaître à chaque instant la pression dans le système, l'état et l'épaisseur du tissu sous perfusion et la conductivité électrique à travers celui-ci. Ces données nous permettent de vérifier l'intégrité de la cornée et l'étanchéité du dispositif.

II.2.3.1 Manomètres pour le milieu de perfusion et le mélange gazeux

Sur le circuit d'alimentation en milieu de perfusion figure un manomètre à eau (Fig. 6). Il consiste en un tube de verre de 4 mm de diamètre intérieur, inséré dans un bloc de plexiglas percé de canaux reliés d'une part à l'oxygénateur, d'autre part à la chambre inférieure. Une échelle millimétrée permet la lecture de la pression dans le circuit, donc de celle régnant du côté endothélial de la cornée. Ce système de mesure simple a montré une sensibilité et une fiabilité suffisantes pour nos besoins expérimentaux.

Le mélange de gaz parvient directement du cylindre qui le contient à l'oxygénateur par l'intermédiaire d'un détendeur. A la sortie de ce dernier est branchée une dérivation qui aboutit à un manomètre à mercure, constitué d'un tube de verre de 4 mm de diamètre intérieur et comportant une échelle millimétrée. Dans l'ensemble des expériences réalisées, le milieu a pu être saturé en oxygène et son pH stabilisé par le CO_2 avec une pression de 40 mmHg du mélange gazeux.

II.2.3.2 Examen optique de la cornée et mesures d'épaisseur

La fenêtre de verre optique (Fig. 4) ménagée dans le couvercle de la chambre supérieure est placée face à la cornée sous perfusion. Ceci permet d'une part l'examen microscopique du tissu, d'autre part, la mesure de son épaisseur. Si des lésions importantes existent, elles

apparaissent nettement lors de cet examen optique.

La lampe à fente utilisée (HAAG-STREIT) est munie d'un dispositif de mesure en profondeur qui, grâce à un oculaire à coïncidence, permet une détermination très précise ($\pm 10 \mu\text{m}$) de l'épaisseur cornéenne totale. Par rapport à une mesure pratiquée directement sur la cornée, celle à travers le verre ne nécessite pas de correction.

II.2.3.3 Conductivimètre électrique

La plupart des auteurs se sont avant tout intéressés à la physiologie de la cornée. Ils ont mesuré soit la résistance électrique^{19,25}, soit la différence de potentiel existant à travers la cornée, sous l'influence de facteurs et de médicaments susceptibles de les modifier^{33-37,57,71,139,140}.

Pour notre part, nous utilisons la détermination de la conductivité électrique comme moyen de contrôle de l'étanchéité du système et de l'état du tissu. Ces mesures ne sont donc pas destinées à faire l'objet d'interprétations liées aux phénomènes de transport ou à entrer en considération dans l'établissement de relations quantitatives avec le médicament qui passe la cornée.

La conductivité est mesurée de la face externe de l'épithélium à la face interne de l'endothélium, à l'aide des électrodes placées de part et d'autre du tissu. Celles-ci sont reliées à un conductivimètre (LABORATOIRE D'ELECTRONIQUE, FACULTE DE MEDECINE, GENEVE) délivrant un courant de sortie de 5 V. Ce courant est modulé, au moyen d'un oscillateur

à la fréquence de 1 kHz, pour éviter toute polarisation artificielle de la cornée et tout effet parasite d'iontophorèse modifiant le passage du principe actif.

II.3 Caractéristiques du modèle en fonctionnement

Nous considérons les différents aspects, caractéristiques et limites d'application de la cellule en fonctionnement. Nous contrôlons l'état des tissus traités et la reproductibilité des données expérimentales que fournissent les conditions fixées. L'influence du milieu d'incubation est observée au niveau des incidences qu'il peut avoir sur les mesures pratiquées en cours d'expérience. Il est ainsi possible de connaître sa part dans la variation des paramètres mesurables.

II.3.1 Débit du milieu de perfusion

Le milieu de perfusion circule dans le système selon le schéma précédemment décrit (Fig. 6). Dans nos conditions expérimentales, il ne s'agit pas de reproduire la vitesse de formation ou d'élimination de l'humeur aqueuse^{40,42}, mais d'étudier au niveau cornéen le passage du médicament. Il convient donc d'établir, compte tenu de la construction du modèle, un débit qui assure un renouvellement assez rapide du milieu passant du côté endothélial, pour pouvoir y doser le principe actif, en particulier lors du travail en circuit fermé. Ce débit doit en outre permettre le maintien d'une pression égale à celle régnant dans l'oeil du lapin "in vivo".

Les différents auteurs de modèles pour l'expérimentation sur la cornée ont utilisé des débits entre $30 \mu\text{l}$ et 2 ml/minute ^{18,20,57,71}. D'autres n'ont pas établi de circulation du milieu, mais ont travaillé avec des volumes plus importants, avec ou sans agitation, celle-ci étant, selon les cas, assurée par le passage du mélange gazeux²⁵.

La géométrie de notre modèle et les faibles dimensions de la chambre inférieure excluent l'installation d'un système d'agitation non susceptible de léser l'endothélium. La circulation du milieu, comme le montrent les constatations expérimentales, suffit à assurer la miscibilité du principe actif qui a passé la cornée avec la solution réceptrice, de même qu'à permettre la mesure reproductible de sa concentration.

Nous avons effectué l'ensemble de nos expériences avec un débit de $1,93 \pm 0,05 \text{ ml/minute}$ du milieu de perfusion, mesuré à la sortie de la chambre inférieure. Pour la circulation de la solution, nous avons utilisé des tuyaux en chlorure de polyvinyle d'un diamètre intérieur de $1,02 \text{ mm}$, la vitesse de la pompe étant réglée à la moitié de l'échelle des valeurs disponibles. La reproductibilité des débits mesurés, même au terme d'une utilisation prolongée, est ainsi optimale. Le coefficient de variation du débit fixé, déterminé sur trois essais, est de $0,51 \%$ après 5 minutes de fonctionnement et de $1,55 \%$ au bout de 120 minutes.

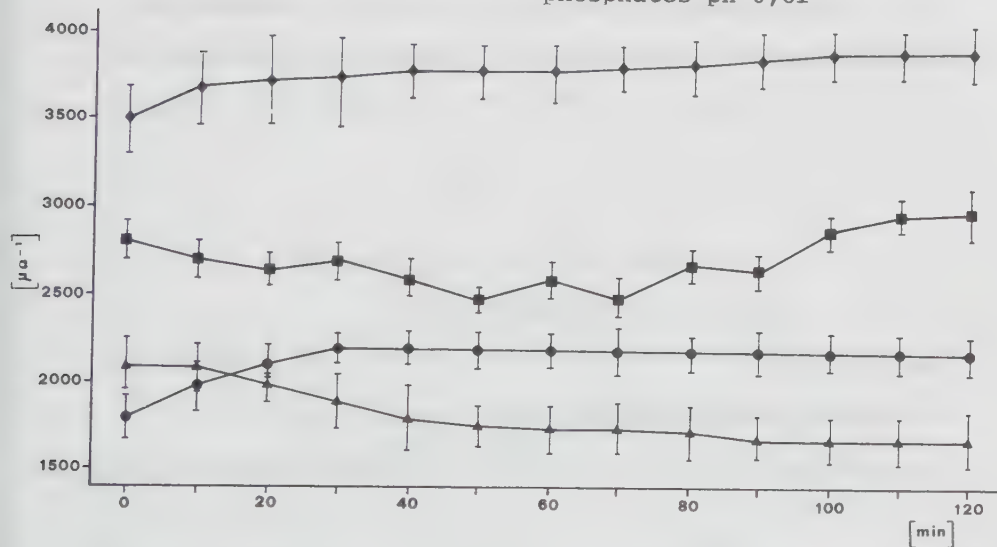
II.3.2 Conductivité électrique

L'évolution de ce paramètre, mesuré à travers la cornée en fonction du temps, a été étudiée avec le milieu de perfusion utilisé et les excipients seuls. Selon les cas, les valeurs observées varient entre 1500 et 4000 $\mu\Omega^{-1}$ (Fig. 7).

Figure 7

PROFILS CONDUCTIVITE / TEMPS

- ◆ tampon phosphates pH 7,38
- procaïne-HCl 10^{-2} mol/l tampon phosphates pH 7,38
- NaCl 0,9 %
- ▲ procaïne-HCl 10^{-2} mol/l tampon phosphates pH 6,81



On constate une plus grande régularité en présence d'une solution tamponnée. Une concentration élevée en électrolytes augmente la conductivité, cependant qu'elle est en général abaissée par les viscosifiants et modifiée dans l'un ou l'autre sens par les tensio-actifs, en relation probable avec leur concentration micellaire.

Toute augmentation importante et durable de la conductivité traduit la présence d'une fuite ou d'un trouble physiologique qui n'a pu être décelé lors de l'examen microscopique ou direct de la cornée.

II.3.3 Épaisseur cornéenne

L'épaisseur de la cornée du lapin est de l'ordre de 0,40 mm. Cette valeur doit se retrouver "in vitro", car un gonflement dépassant les limites de la réversibilité fausserait les valeurs expérimentales.

L'épaisseur cornéenne est contrôlée à chaque prélèvement en vue de dosage, comme l'indique le graphique de la figure 8 qui montre son évolution en fonction du temps et des conditions appliquées.

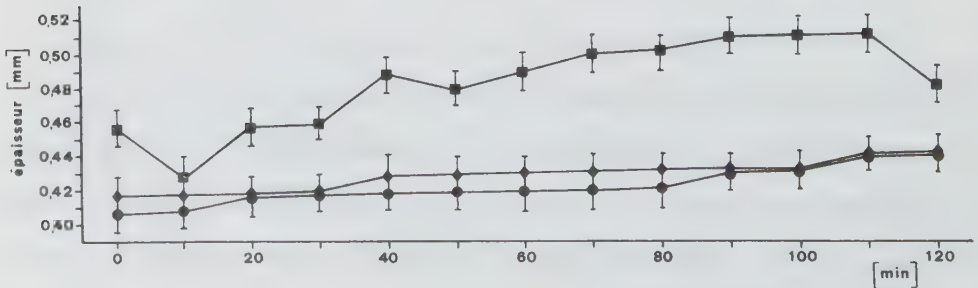
Figure 8

PROFILS EPAISSEUR / TEMPS

■ NaCl 0,9 %

◆ tampon phosphates pH 7,38

● procaine-HCl 10^{-2} mol/l dans le tampon phosphates pH 7,38



II.3.4 Contrôle statistique de la reproductibilité des résultats

Nous avons examiné la reproductibilité des résultats dans le cadre de deux séries d'essais différentes. Durant la partie de l'expérience comprise entre 30 et 90 minutes, l'augmentation de la concentration en principe actif dans l'humeur aqueuse artificielle est une fonction linéaire du temps (Fig. 9 et 10). Cette notion a été vérifiée par un test statistique. Chaque expérience a fait l'objet de dix répétitions. Les pentes des droites obtenues à partir des valeurs de l'absorption en ultraviolet pour le médicament, à une longueur d'onde où existe un maximum, sont comparées à la pente résultant de la moyenne des dix essais.

Figure 9

REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS

Procaïne-HCl 10^{-2} mol/l, tampon phosphates pH 7,38

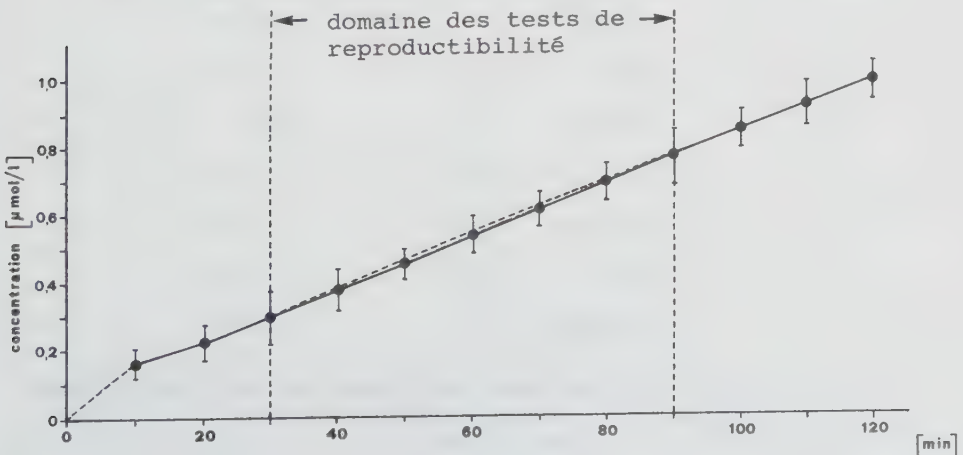
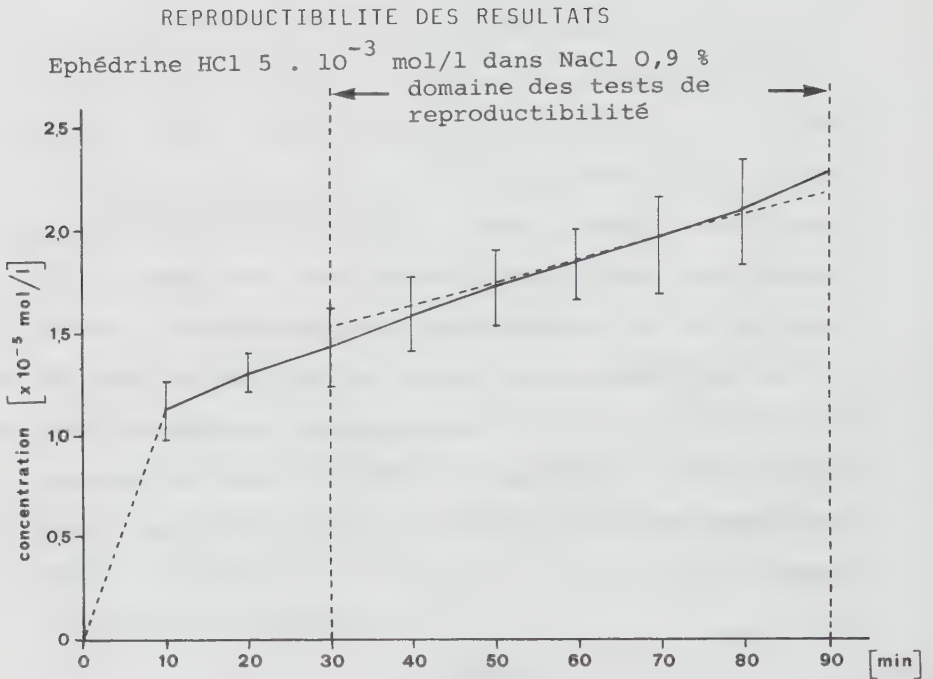


Figure 10



Les conditions expérimentales sont les suivantes:

le milieu nutritif est la solution de Krebs-Ringer bicarbonatée, décrite par DONN ET COLL.¹⁸, et qui a pour formule (mmol/l):

NaCl	118,00
KCl	4,70
NaHCO ₃	25,0
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	2,50
KH ₂ PO ₄	1,18
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,18
Glucose	27,80

Les préparations appliquées du côté épithélial de la cornée sont respectivement:

- solution de chlorhydrate de procaine 10^{-2} mol/l dans un tampon à pH 7,38 (NaH_2PO_4 0,066 mol/l 20 % + Na_2HPO_4 0,066 mol/l 80 %) rendue isocryoscopique par adjonction de chlorure de sodium. Les mesures de concentration sont effectuées au maximum d'absorption de 290 nm en UV.
- solution de chlorhydrate d'éphédrine $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l non tamponnée, de pH 6,40 environ, amenée à l'isocryoscopie par adjonction de chlorure de sodium. Les mesures de concentration sont faites au maximum d'absorption de 257 nm en UV.

Pour chacune des expériences, les comparaisons entre les pentes ont été faites sur une période de 60 minutes, commençant 30 minutes après le début effectif de l'essai (application du principe actif), alors que les conditions d'épaisseur, de conductivité électrique et de transport sont stabilisées.

Les résultats de ces comparaisons sont rapportés dans les tableaux 3 et 4, qui donnent l'ensemble des paramètres de l'analyse statistique.

T a b l e a u 3

Reproductibilité des résultats dans les expériences avec le chlorhydrate de procaine			
Test de linéarité effectué entre 30 et 90 minutes d'expérience			
Variabilité	Somme des carrés	d.d.l.	Carré moyen
Autour de la régression	$9,309 \cdot 10^{-1}$	1	$9,309 \cdot 10^{-1}$
Autour de la droite	$1,468 \cdot 10^{-4}$	5	$2,930 \cdot 10^{-5}$
A l'intérieur	$4,461 \cdot 10^{-2}$	63	$7,366 \cdot 10^{-4}$
$F_{\text{calc.}} = 0,0397$		$F_{0,05}^{(5;63)} = 2,3600$	
Test de parallélisme			
Pente de la droite de référence: $5,766 \cdot 10^{-3}$			
Pente de la droite pour chaque essai ($\cdot 10^{-3}$)	Différence avec la pente de la droite de référence ($\cdot 10^{-4}$)	$t_{\text{calc.}}$	
6,071	3,054	0,607	
6,446	6,804	1,353	
6,071	3,054	0,607	
5,679	0,875	0,174	
5,536	2,303	0,459	
5,643	1,232	0,246	
5,500	2,660	0,532	
5,643	1,232	0,246	
5,214	5,518	1,099	
5,875	1,091	0,218	
Valeur de $t_{0,05}^{(73)} = 1,9931$; toutes les valeurs de $t_{\text{calc.}}$ sont inférieures, on peut donc accepter l'hypothèse de parallélisme			

T a b l e a u 4

Reproductibilité des résultats dans les expériences avec la chlorhydrate d'éphédrine

Test de linéarité effectué entre 30 et 90 minutes d'expérience

Variabilité	Somme des carrés	d.d.l.	Carré moyen
Autour de la régression	$3,680 \cdot 10^{-2}$	1	$3,680 \cdot 10^{-2}$
Autour de la droite	$9,480 \cdot 10^{-5}$	5	$1,890 \cdot 10^{-5}$
A l'intérieur	$1,469 \cdot 10^{-1}$	63	$2,332 \cdot 10^{-4}$

$$F_{\text{calc.}} = 0,0810$$

$$F_{0,05}^{(5;63)} = 2,3600$$

Test de parallélisme

Pente de la droite de référence: $1,146 \cdot 10^{-3}$

Pente de la droite pour chaque essai ($\cdot 10^{-3}$)	Différence avec la pente de la droite de référence ($\cdot 10^{-4}$)	$t_{\text{calc.}}$
1,286	1,393	0,492
1,143	0,036	0,013
1,286	1,393	0,492
1,036	1,107	0,393
0,893	2,356	0,899
0,688	4,589	1,622
1,188	4,110	0,145
1,056	1,107	0,293
1,357	2,107	0,739
1,553	4,071	1,439

Valeur de $t_{0,05}^{(73)} = 1,9931$; toutes les valeurs de $t_{\text{calc.}}$ sont inférieures, on peut donc accepter l'hypothèse de parallélisme

II.4 Examen histologique des tissus

En plus de la notion de reproductibilité des résultats, il convient d'apporter une réponse à la question de savoir si les conditions expérimentales préservent l'intégrité des tissus.

L'examen en microscopie optique fournit des indications de portée globale. Le problème doit également être étudié au niveau des barrières cellulaires qui, les premières, conditionnent le passage du médicament à travers la cornée.

Nous décrivons ici les résultats d'expériences au terme desquelles la cornée a été fixée "in camera" par le glutaraldéhyde, puis traitée au tétroxyde d'osmium et examinée en microscopie électronique.

La première constatation, valable pour toutes les expériences, est essentielle: épithélium et endothélium sont présents et complets.

Un témoin a été préparé et fixé aussitôt après prélèvement sur le lapin, sans passage dans la cellule (Fig. 11). Il représente une référence dans la comparaison avec les autres préparations et un moyen de déceler d'éventuels dégâts occasionnés par les manipulations chirurgicales.

Des essais ont ensuite eu lieu à trois valeurs de pH: 6,24, 7,38 et 8,04, en traitant durant 30 minutes une cornée placée dans la cellule, avec du côté endothélial la solution de Krebs-Ringer bicarbonatée et du côté épithélial, les tampons phosphates aux valeurs de pH indiquées.

A pH 7,38, l'examen des coupes histologiques réalisées à l'issue du traitement (Fig. 12) montre que le tissu s'adapte à son nouveau milieu et ne présente pas de lésion pouvant influencer sur sa perméabilité. Seul un certain gonflement est observé, mais il disparaît après 30 minutes d'expérience (phénomène de "temperature reversal", caractéristique de l'état fonctionnel des tissus^{42,43}).

En revanche, à pH 6,24 (Fig. 13) et à pH 8,04 (Fig. 14), des différences avec ce qui est observé à la précédente valeur peuvent être constatées. La perfusion à pH alcalin est moins bien supportée que celle à pH acide⁸⁹. Cependant, contre toute attente, l'épithélium est relativement moins altéré à pH 8,04 qu'à pH 6,24. Néanmoins, l'alcalinité cause des troubles au niveau endothélial. L'effet du tampon à pH 6,24 consiste en atteintes telles qu'oedèmes intercellulaires limités que la régénération rapide des tissus rend le plus souvent réversibles, du moins "in vivo". A cette même valeur de pH, l'endothélium peut être considéré comme intact.

Figure 11

CORNEE FIXEE AUSSITOT APRES PRELEVEMENT SUR LE LAPIN
(Grossissement 27000 fois)



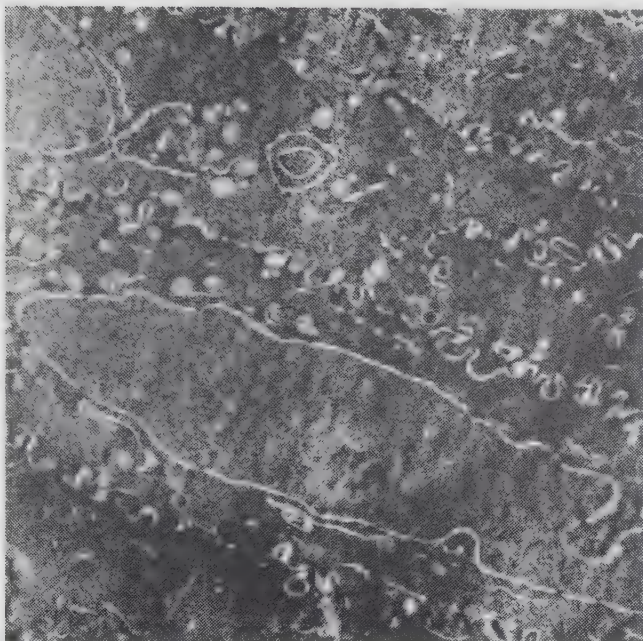
Cette préparation est considérée comme un témoin.
L'iris a été disséqué à l'aide de ciseaux et le tissu fixé
par le glutaraldéhyde, puis le tétroxyde d'osmium.

La morphologie cellulaire est normale; on cons-
tate la desquamation physiologique des couches superficiel-
les et la régularité des espaces intercellulaires.

Figure 12

CORNEE TRAITEE "IN CAMERA" DURANT 30 MINUTES, A pH 7,38

(Grossissement 27000 fois)

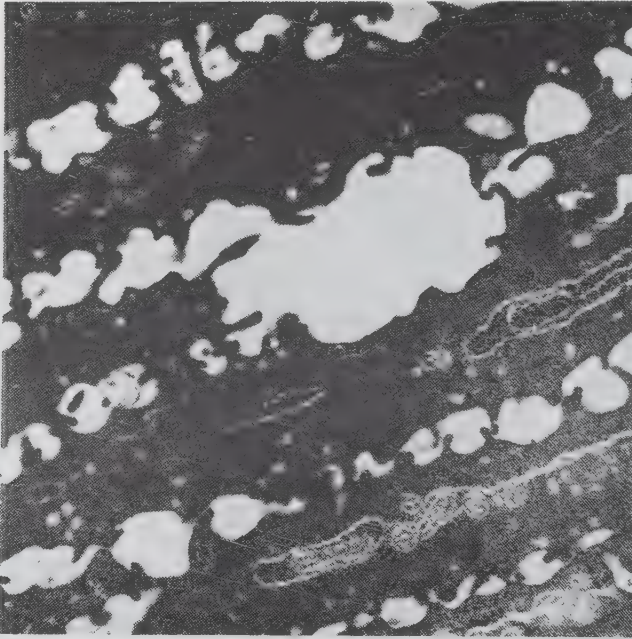


La morphologie cellulaire est normale. Seul apparaît un léger gonflement et une faible augmentation de densité des mitochondries.

Figure 13

CORNEE TRAITEE "IN CAMERA", DURANT 30 MINUTES, A pH 6,24

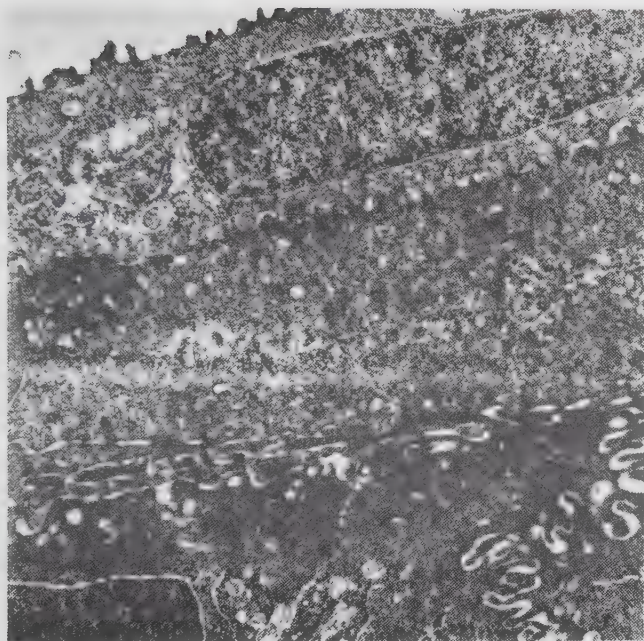
(Grossissement 27000 fois)



Oedème épithélial intercellulaire réversible, augmentation des espaces intercellulaires, rupture des complexes jonctionnels (réversible). Au niveau endothélial: altération et gonflement des mitochondries, la structure interne étant conservée, augmentation de la tortuosité, élargissement des citernes et réticulum endoplasmique granulaire.

Figure 14

CORNEE TRAITEE "IN CAMERA", DURANT 30 MINUTES, A pH 8,04
(Grossissement 27000 fois)



Faibles lésions épithéliales, légère augmentation des espaces intercellulaires avec oedème superficiel limité, lésions endothéliales plus approfondies avec gonflement des mitochondries qui comprennent peu de crêtes, perte momentanée de l'organisation membranaire.

II.5 Manipulations expérimentales

Ce chapitre décrit les opérations de préparation de l'expérience, du prélèvement de la cornée sur le lapin aux mesures de concentration dans l'humeur aqueuse artificielle.

II.5.1 Prélèvement, préparation et montage de la cornée

Les auteurs d'expériences "in vitro" sur la cornée ont proposé différentes méthodes pour éviter au tissu de trop grandes déformations mécaniques ou des lésions par les instruments chirurgicaux^{18,25,57,71,122}.

Nous inspirant de ces techniques et sur la base de différents essais, nous avons retenu la manière de procéder décrite ci-dessous.

Les animaux d'expérience sont des lapins albinos ou à pelage coloré, d'un poids de 2,5 à 3 kg, choisis indifféremment mâles ou femelles. Des essais préalables ont été effectués pour déterminer dans quelles conditions il convenait de prélever la cornée. Nous avons opéré d'une part sur le lapin vivant, anesthésié au pentobarbital sodique appliqué par voie intraveineuse, d'autre part, aussitôt après la mort^{141,142}. Nous avons pu conclure que cette dernière manière de procéder, que nous avons retenue, présente toutes les qualités nécessaires à notre expérimentation.

Une fois la tête séparée du corps, les paupières sont maintenues ouvertes à l'aide d'un écarteur. L'épaisseur cornéenne est mesurée "in situ" grâce à la lampe à

fente et à son pachymètre. On procède ensuite au prélèvement de la cornée, opération durant laquelle on l'humecte fréquemment d'une solution de NaCl à 0,9 % pour prévenir son dessèchement.

Après avoir enlevé l'écarteur, on fait saillir le globe oculaire de l'orbite en exerçant une pression du pouce sur les paupières. L'oeil est maintenu à l'aide d'une pincette anatomique dentée, au moyen de laquelle on saisit un muscle, à travers la conjonctive bulbaire. Avec des ciseaux à énucléation, en écartant les lames, on dégage le pourtour du globe, on coupe les muscles tenus par la pincette le plus près possible de leur insertion sur le globe, puis on en fait de même du nerf optique. L'oeil ainsi libéré est plongé dans une solution de Krebs-Ringer bicarbonatée, à 37°C (la même que celle utilisée comme milieu de perfusion) préalablement oxygénée par passage dans l'appareil à membranes de silicone.

Le globe est saisi au niveau du limbe avec des pincettes, puis la conjonctive est découpée. Les ciseaux à énucléer fermés sont insérés entre sclérotique et conjonctive qui sont séparées l'une de l'autre par écartement des lames. La conjonctive est enlevée. L'oeil, ainsi débarrassé des tissus adjacents, est incisé au scalpel près de son pôle postérieur. On insère les ciseaux dans l'ouverture pratiquée et on découpe les tissus selon une ligne équatoriale, jusqu'à environ 2 mm du limbe. La sclérotique est ensuite découpée en suivant le bord de la cornée et en ménageant un anneau d'à peu près 2 mm. La cornée ainsi préparée, à

laquelle adhère l'iris et parfois le cristallin, est transférée dans une boîte de Petri contenant du milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté. Après enlèvement du cristallin qui se sépare par simple déplacement latéral, on saisit l'iris par son bord intérieur, c'est à dire du côté de la pupille, on pratique une découpe radiale, puis on excise l'iris selon un trajet circulaire, le long de la bordure de sclérotique. Il faut veiller, durant ces opérations, à ne pas léser l'endothélium, mince et fragile, faute de quoi la cornée gonflera de manière irréversible. On contrôle à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement 30 fois) que l'endothélium n'a pas été arraché et ne présente ni plis, ni traces de déchirures. La cornée est alors prête pour le montage dans son support.

On enduit le filetage de la bague de fixation de graisse d'étanchéité et on y place une première rondelle de plexiglas sur laquelle on dépose la cornée en la tenant par la bordure de sclérotique, face épithéliale vers le bas. On veille à sa disposition régulière sur le pourtour de la bague, puis on place la deuxième rondelle, munie d'ergots latéraux, en contrôlant encore une fois le centrage de la cornée. Celle-ci est alors prête au montage sur la cellule.

II.5.2 Protocole expérimental

En premier lieu, la circulation d'eau thermostatée qui tempère le système est enclenchée et le réservoir rempli de 25 ml de milieu de perfusion. On place alors la mem-

brane de caoutchouc qui recouvre le réservoir et par l'un des trous qui sont pratiqués dans celle-ci, on y plonge le tuyau qui conduit la solution à la pompe, puis à l'oxygénéateur. Les robinets à trois voies (Fig. 6), placés sur le circuit d'alimentation, sont orientés de manière à ce que le milieu ne passe pas dans la cellule, mais emprunte directement le circuit de retour, pour revenir au réservoir de départ. La pompe est alors mise en marche à la vitesse fixée et l'alimentation en mélange gazeux ouverte, en contrôlant que la pression indiquée par le manomètre à mercure atteigne 40 mmHg. On attend l'apparition du milieu dans le manomètre à eau, puis son passage dans le circuit de retour. Lorsque la solution est revenue au réservoir de départ, on règle la pression dans le circuit à la valeur choisie, grâce à la vis agissant sur le tuyau de retour au réservoir. Dès que l'on a vérifié la régularité de la circulation en milieu nutritif, on peut procéder au montage de la cornée.

Les bords de la chambre supérieure et ceux de son couvercle sont enduits de produit d'étanchéité, de même que le filetage destiné à recevoir la bague où est montée la cornée. On visse celle-ci sur la cellule et on modifie la position des robinets, pour faire passer le milieu dans la chambre inférieure. La pression dans le circuit est ajustée à la valeur fixée et contrôlée sur le manomètre à eau. Durant les opérations de montage, on humecte fréquemment la face épithéliale de la cornée de solution de NaCl à 0,9 % pour qu'elle ne se dessèche pas.

Une fois les conditions requises obtenues, on place le couvercle que l'on fixe à l'aide de ses quatre vis, on branche les électrodes au conductivimètre et on introduit aussitôt la préparation à tester ou la solution de conditionnement du tissu et on visse le bouchon de l'orifice de remplissage. Aux intervalles de temps choisis, on mesure conductivité électrique, épaisseur cornéenne et concentration dans le réservoir de départ. Au cas où le dosage du principe actif nécessite une réaction chimique sur la quantité de solution prélevée, rendant impossible la remise de celle-ci dans le circuit, on ajoute dans le réservoir une quantité de milieu nutritif équivalente à celle prélevée.

Si l'on travaille en circuit ouvert, le milieu de perfusion est contenu dans un erlenmeyer plongé dans l'eau de thermostatisation. Le tuyau de retour n'aboutit pas au réservoir, mais à un autre récipient où est recueillie l'humour aqueuse artificielle passée du côté endothélial de la cornée, pour y doser le principe actif. Dans ces conditions, on opère avec un milieu constamment renouvelé.

En fin d'expérience, la chambre supérieure est vidée de son contenu par aspiration. Le couvercle est ôté et on procède à un rinçage. On fait alors circuler de l'eau, puis, selon les cas, un détergent dans le circuit. On rince enfin à l'eau distillée pendant un minimum de 30 minutes.

Si l'on examine un système dispersé dont la phase interne tend à sédimenter, on peut utiliser l'agitateur (barreau magnétique) placé à l'intérieur du couvercle, en

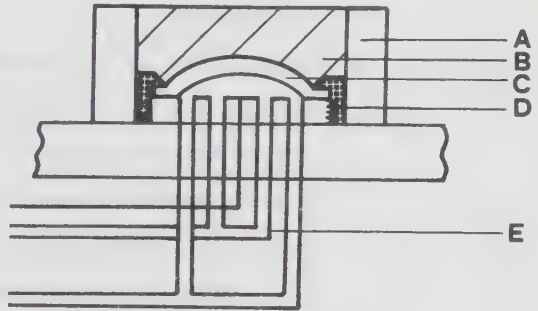
l'actionnant de l'extérieur par un aimant tournant mû par un moteur électrique fonctionnant à une vitesse fixe, choisie entre 60 et 300 tours par minute.

Pour tester une pommade ou un gel de consistance élevée, on munit la bague de fixation de la cornée d'un cylindre (Fig. 15), ceci après son montage dans la cellule. Le couvercle de la chambre supérieure n'est alors pas utilisé, la hauteur du cylindre dépassant le niveau de cette dernière.

Figure 15

MODIFICATION DE LA BAGUE POUR LES ESSAIS AVEC LES POMMADES

- A cylindre
- B pommade
- C cornée
- D bague
- E alimentation en milieu nutritif



La quantité de pommade est calculée ainsi: on place une quantité connue de préparation sur une spatule que l'on pèse avec la pommade. On remplit ensuite le cylindre à ras, en veillant à bien couvrir toute la surface cornéenne. On pèse alors à nouveau la spatule, le poids de pommade appliqué étant connu par différence. Les autres

opérations expérimentales restent les mêmes que pour les solutions, à ceci près que l'on ne peut mesurer la conductivité électrique et l'épaisseur cornéenne qu'en début et en fin d'expérience.

II.6 Conclusions

Pour conclure et résumer cette description du modèle et des différents aspects de son fonctionnement, nous pouvons faire les remarques suivantes:

- Le but recherché, à savoir la possibilité d'étudier "in vitro" le transport de médicaments à travers la cornée maintenue fonctionnelle, peut être considéré comme atteint par la réalisation de la cellule mise au point.
- Le procédé de prélèvement de la cornée ne lèse pas celle-ci et la rend prête au montage dans le système en un temps minimum.
- Les différents appareils de mesure du modèle permettent un contrôle continu de son fonctionnement et de l'état du tissu sous perfusion.
- La reproductibilité des résultats expérimentaux, vérifiée par la statistique, permet de considérer comme valables et comparables les données expérimentales fournies par le modèle.
- L'examen histologique des tissus après perfusion dans différentes conditions montre que les tissus ne sont pas irréversiblement lésés par le procédé utilisé. Les désordres observés dans les conditions extrêmes

de pH restent limités.

- L'emploi d'un protocole expérimental approprié permet de soumettre à des essais solutions, systèmes dispersés et formes semi-solides, au prix d'adaptations minimales.

III. Application du modèle au transport de quelques principes actifs et influence de divers paramètres

Cette partie du travail traite des expériences effectuées une fois le modèle mis au point et ses caractéristiques déterminées.

Les résultats des essais systématiques avec la procaïne, l'éphédrine, l'oxyphenbutazone et le Diclofénac sont présentés avec leur développement cinétique, les comparaisons entre eux et l'interprétation qui en est proposée.

III.1 Traitement des résultats expérimentaux: bases théoriques

III.1.1 Notion et modèle de transport

Le passage des molécules à travers les barrières biologiques est régi par différents processus liés à la nature de la substance et aux propriétés particulières du tissu.

Ainsi, l'eau⁵⁷, les électrolytes²⁸ et le glucose³¹, qui interviennent dans les échanges métaboliques intenses dont la cornée est le siège, sont pour leur plus grande part transportés activement, seule une faible proportion l'étant par la voie passive⁴³. Cette dernière caractérise l'absorption de la plupart des médicaments. Elle est valable pour la cornée également. Les couches cellulaires limitantes opposent aux médicaments une barrière dont l'importance est fonction des critères développés dans la

première partie de ce travail: solubilité, coefficient de partage, pH et présence d'adjuvants pour rappeler les principaux.

Le transport par diffusion passive, constaté dans tous les cas que nous avons examiné, dépend, pour la cornée, de son hydratation et du transport de l'eau^{60,142}.

Les données fournies par le choix de références consultées font état de résultats dont la comparaison entre eux et avec nos propres constatations expérimentales est difficile. En effet, la variété des méthodes, des techniques et des buts poursuivis a justifié des conditions particulières à chaque cas, d'où les différences importantes constatées d'un travail à l'autre. Ce n'est qu'au niveau des paramètres électriques de la cornée qu'apparaît une certaine unité dans les publications récentes^{35,36,38}.

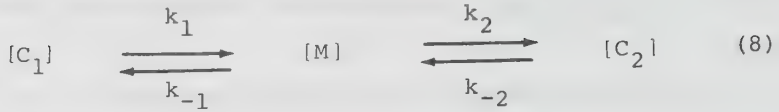
III.1.2 Aspect cinétique du transport

Dans le cas particulier de la cornée, la quantité de principe actif qui parvient dans la chambre antérieure, par rapport à celle appliquée à la surface du tissu, demeure très faible¹⁴³. Les limites de survie de la cornée, dans l'expérimentation "in vitro", ne permettent pas la poursuite de l'expérience jusqu'à l'équilibre des concentrations de part et d'autre du tissu.

Le transport peut se décrire ainsi: une solution de concentration C_1 est séparée d'une solution plus diluée de concentration C_2 par une membrane permettant la diffusion qui a lieu exclusivement à son niveau. Le volume des

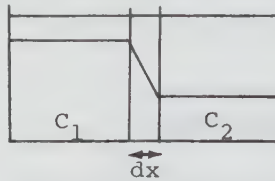
solutions demeure constant.

Nous avons:



où M représente la concentration dans la membrane. Le fait que C_2 soit beaucoup plus faible que C_1 autorise à négliger la vitesse k_{-2} de retour vers M.

Dans notre modèle, le volume circulant dans le compartiment récepteur est plus important que celui introduit dans la chambre supérieure. Le schéma suivant illustre le transport à travers la membrane et l'établissement d'un gradient de concentration uniforme, puis la diffusion constante, une fois ce gradient établi.



Il s'agit ici d'une diffusion en régime constant, aléatoire à réaliser sur le plan expérimental, en particulier avec des membranes biologiques^{141,143,145}. De ce fait, on utilise la notion de régime quasi constant, où le gradient de concentration ne varie que faiblement avec le temps. Dans la mesure où l'on peut tenir pour négligeables les interactions entre principe actif, solvant et membrane, le transport peut être décrit par la première loi de Fick:

$$\frac{dn}{dt} = - DA \frac{dc}{dx} \quad (9)$$

où $\frac{dn}{dt}$ représente le flux, nombre de molécules passant l'unité de surface dans l'unité de temps, $\frac{dc}{dx}$ est le gradient de concentration et D exprime le coefficient de diffusion [surface . temps⁻¹], définissant, pour un gradient de concentration $\frac{dc}{dx}$ égal à 1, le nombre de moles de substance diffusant durant l'unité de temps à travers l'unité de surface.

$$D = \frac{dQ}{A dt \frac{dc}{dx}} \quad (10)$$

dQ est la quantité de substance qui traverse la surface A, dans l'intervalle de temps dt, sous l'effet du gradient de concentration $\frac{dc}{dx}$. Exprimées en termes de perméabilité, ces valeurs prennent la forme¹⁴⁶:

$$\frac{dn}{dt} = - PA dc \quad (11)$$

P [longueur . temps⁻¹] est le coefficient de perméabilité équivalent à:

$$P = \frac{D}{h} \quad (12)$$

où h = épaisseur de la membrane.

Le régime de diffusion quasi constante qui caractérise nos conditions expérimentales peut être décrit par l'équation suivante:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{V_2 \cdot dc_2}{dt} = - \frac{V_2 \cdot dc_1}{dt} = \frac{A \cdot D}{h} (C_1 - C_2) \quad (13)$$

ou, après transformation:

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{A \cdot D}{V_2 \cdot h} (C_1 - C_2) \quad (14)$$

V_1 et V_2 sont les volumes de solution de part et d'autre de la membrane. La quantité totale S de produit dissous reste constante; en admettant que celle contenue dans la membrane est négligeable, on obtient alors:

$$S = C_1 V_1 + C_2 V_2 \quad \text{où} \quad C_1 = \frac{S - C_2 V_2}{V_1} \quad (15)$$

En remplaçant, dans l'équation (14), C_1 par l'expression de l'équation (15), on aura:

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{A \cdot D}{h \cdot V_2} \left[\frac{S}{V_1} - \frac{C_2 (V_2 + V_1)}{V_1} \right] \quad (16)$$

C_2 vaut initialement 0, mais le fait que V_2 soit différent de V_1 n'autorise pas de simplification plus poussée. Pour notre modèle: $V_2 = 1,25 V_1$.

Dans l'expression (16), les quantités suivantes sont constantes:

$$\frac{A \cdot D}{h \cdot V_2} = R_1 \qquad \frac{S}{V_1} = R_2 \qquad \frac{(V_2 + V_1)}{V_1} = R_3$$

Seul R_1 varie selon le coefficient de diffusion de la substance testée; R_2 est constant dans toutes les expériences, puisqu'il est lié à la construction du modèle. Enfin, R_3 vaut 2,25.

$\frac{A \cdot D}{V_2}$ est exprimé par la constante P.

En intégrant entre les limites $C_2 = 0$ et C_2 et $t = 0$ et t , l'équation (16), on obtient l'expression finale suivante:

$$\ln \left[\frac{C_i - 2,25 C}{C_i} \right] = \left[\frac{- 2,25 P}{h} \right] \cdot t \quad (17)$$

C_i étant la concentration initiale et C la concentration au temps t. Cette équation décrit le transport dans des conditions d'état quasi stationnaire. En portant graphiquement $-\ln [(C_i - 2,25 C) / C_i]$ en fonction du temps, on obtient une droite dont la pente vaut $2,25 P / h$. P, explicité dans l'expression (12) est le coefficient de perméabilité qui décrit la vitesse de transport, après établissement d'un gradient de concentration uniforme¹⁴⁴⁻¹⁴⁸.

En pratique, la pente de la droite est calculée par la méthode des moindres carrés, à partir des valeurs de l'expression $-\ln [(C_i - 2,25 C) / C_i]$ et de celles des intervalles de temps. Un test statistique permet de déterminer si les valeurs trouvées sont effectivement une fonction linéaire du temps. Ces opérations ont été réalisées grâce à un programme traité sur l'ordinateur CDC 3800 du Centre de Calcul Electronique de l'Université de Genève. Dans les quelques cas où les résultats du test de linéarité étaient négatifs, c'est à dire lorsque nous n'avons pu considérer la droite des moindres carrés comme une expression rigoureuse de la diffusion, nous avons tenté l'ajustement en

recourant à la méthode du maximum de vraisemblance. Celle-ci est rendue possible par un programme itératif (MALIK)¹⁴⁹ d'ordinateur, tiré de la bibliothèque de programmes. Compte tenu des étapes de calcul et des approximations que suppose la méthode, celle-ci n'a pas apporté d'amélioration par rapport au résultat fourni par la droite de régression calculée à partir de nos valeurs expérimentales.

La comparaison des pentes s'effectue au moyen d'un test de t de Student, permettant de déterminer si les différences constatées sous l'effet de changements de formulation sont significatives.

III.1.3 Transport en présence d'adjuvants tensio-actifs et viscosifiants

Les adjuvants tensio-actifs et viscosifiants sont ajoutés aux préparations ophtalmiques pour augmenter, prolonger ou modérer le transport du principe actif.

Les relations entre médicament et tensio-actif peuvent être fonction de la concentration micellaire ou déterminées par la formation de complexes entre substance et adjuvant^{145,151}.

L'effet des viscosifiants peut résulter d'une interaction, due à leur poids moléculaire élevé et en partie réversible, avec la molécule médicamenteuse. Selon la nature chimique de cette dernière¹¹⁴, la biodisponibilité du principe actif peut se trouver diminuée. De plus, le viscosifiant peut agir sur le tissu cornéen ou la pellicule lacrymale baignant la face antérieure de l'oeil. Aucun

polymère ionique n'étant employé dans nos essais, l'influence de l'effet Donnan n'entre pas en cause.

L'action des viscosifiants sur la libération du principe actif à partir des formes ophtalmiques a été étudiée par NATH ET SHINGBAL¹⁵¹, avec l'atropine et la procaïne. Pour le premier de ces deux médicaments, ils constatent "in vitro", à l'aide d'une membrane artificielle, que la libération se trouve fortement diminuée par la carboxyméthylcellulose sodique, alors que l'effet de la méthylcellulose et de la polyvinylpyrrolidone est moindre et, selon ces auteurs, lié à la viscosité. On constate donc une interaction marquée entre polymères ioniques et atropine, les expériences ayant mis en évidence la tendance à la formation de complexes entre ces substances.

Nous exprimons le rapport entre les vitesses de transport avec et sans adjuvant, lors de l'emploi de tensio-actifs ou de viscosifiants, par:

$$R = \frac{\text{vitesse de transport avec adjuvant}}{\text{vitesse de transport sans adjuvant}}$$

III.2 Transport de la procaïne

Le choix de la procaïne comme traceur peut prêter à discussion, car elle est essentiellement destinée à l'anesthésie de surface des tissus. Sa solubilité élevée, la possibilité de dosage en ultraviolet à 290 nm, même à très faible concentration, ce qui évite le recours à des produits marqués, de même que les comparaisons possibles avec des travaux proches des nôtres^{3,4}, ont néanmoins plaidé

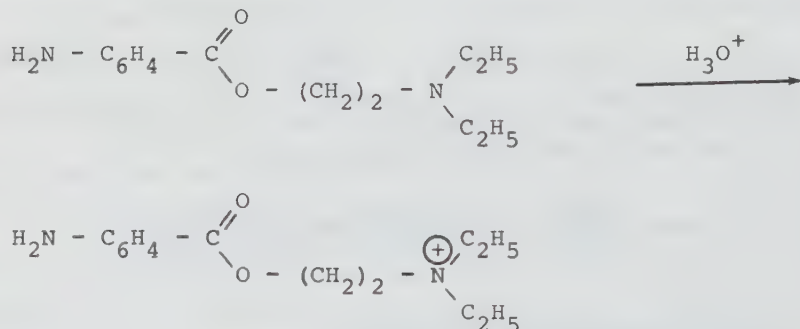
en faveur de cette sélection.

Les modifications de pH, dans les limites de tolérance de l'oeil, assurent un changement suffisamment marqué de la proportion de forme ionisée pour en mesurer variablement les effets⁷⁵ (Fig. 3).

Enfin, la compatibilité chimique avec les adjuvants employés et la stabilité de la procaine durant le temps d'expérience n'ont pas suscité de difficultés.

La pénétration de la molécule sera fonction de sa capacité à franchir les barrières lipidiques¹⁵⁴ (importance de la forme faiblement ionisée, donc du pH).

L'ionisation de la procaine a lieu selon la réaction suivante:



Tous les essais ont été réalisés dans le tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$, rendu isocryoscopique par adjonction de NaCl , décrit par HIND ET GOYAN⁷⁵. Le mode opératoire détaillé, semblable pour toutes les expériences, est celui décrit dans la deuxième partie du travail.

T a b l e a u 5

Conditions de formulation de la procaïne-HCl 10^{-2} mol / l

a) Essais sans adjuvants

pH 6,81

pH 7,38 avec et sans traitement préalable de la cornée
par la solution tamponnée seule

pH 8,04

b) Essais avec adjuvants

Concentration

Nature de l'adjuvant

pH 7,38

pH 6,81

Tensio-actifs

Non ioniques

Tween^R 80

0,01 %

0,10 %

1,00 %

1,00 %

Tween^R 20

0,01 %

1,00 %

1,00 %

Cationiques

Benzalkonium Cl⁻

0,01 %

0,10 %

0,01 %

0,10 %

Cétylpyridinium Cl⁻

0,01 %

0,01 %

Anionique

Oléate de Na

0,01 %

0,01 %

Viscosifiant

Méthylcellulose

4000 cP

0,50 %

0,50 %

III.2.1 Résultats et interprétation

Chaque paramètre et l'influence de chaque adjuvant sont examinés successivement. Un tableau général (Tableau 6), à la fin du chapitre III.2, permet de constater l'effet de chacune des conditions expérimentales et sa signification par rapport à l'expérience de référence.

Le nombre de répétitions nécessaires pour chaque essai, compte tenu de la différence minimum δ entre les pentes décelable par notre méthode de mesure et de l'ordre de grandeur de la variance σ^2 déterminé dans les expériences préliminaires, est estimé grâce à la formule suivante, basée sur le t de Student, donné par les tables au niveau de probabilité choisi:

$$n = (t_{2\alpha} + t_{2\beta})^2 \frac{\sigma^2}{\delta^2} \quad (18)$$

où n est le nombre de répétitions, $t = t^{(\infty)}$ au seuil de probabilité fixé, α = risque estimé d'une erreur de première espèce (acceptation d'une hypothèse fausse), β = risque estimé d'une erreur de deuxième espèce (rejet d'une hypothèse vraie). Nous avons choisi $\alpha = 5 \%$ et $\beta = 10 \%$. Nous tirons de la formule que deux expériences au minimum sont nécessaires pour chaque condition. Dans la plupart des cas, nous avons cependant effectué trois répétitions, pour nous assurer de la stabilité des conditions.

III.2.1.1 Influence du pH et du traitement préalable de la cornée par la solution tampon

Aux valeurs de pH où les expériences ont été effectuées, la proportion de procaïne non ionisée est la suivante:

pH 8,04	12,4 %
pH 7,38	3,4 %
pH 6,81	0,9 %

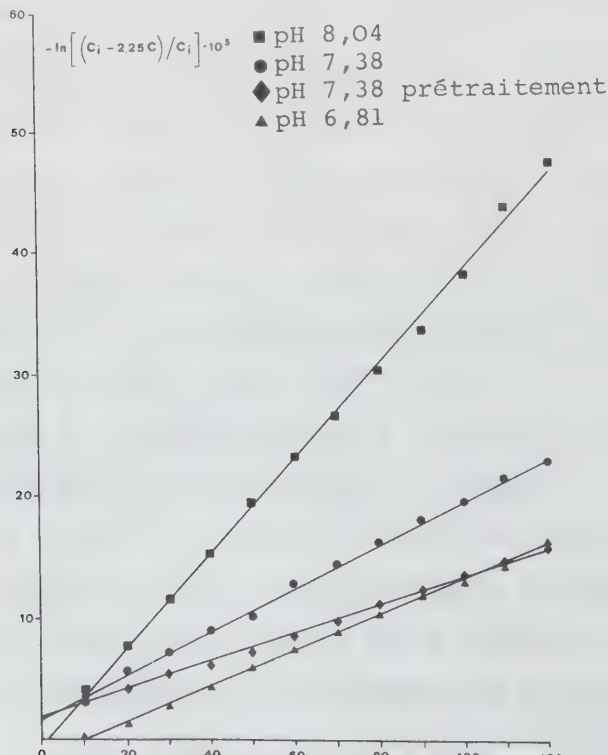
Les résultats expérimentaux concordent avec la théorie, puisque c'est à la valeur de pH la plus élevée que le transport est le plus important. La procaïne étant une base faible ($pK_a = 8,85$), l'augmentation du pH entraînera, selon les équations de Henderson-Hasselbach (6), une diminution conjointe de la concentration en forme électriquement chargée, inapte à traverser la barrière lipophile constituée par l'épithélium. Les différences entre les pentes des droites de régression calculées à partir des résultats (Fig. 16) sont significatives ($p = 0,05$).

Les deux séries d'expériences à pH 7,38, si elles portent sur le même principe actif, à une concentration égale, dans un véhicule semblable, présentent la différence suivante: dans l'une des deux séries, sans modifier le protocole expérimental général, la face épithéliale de la cornée a été traitée "in camera" avec la solution tamponnée seule, jusqu'à stabilisation de l'épaisseur du tissu, signe de l'état stationnaire physiologique. La solution ayant servi au traitement préalable a été alors aspirée, puis remplacée par la préparation médicamenteuse. Ce mode opératoire

stabilise le processus de transport qui se révèle plus régulier que lors de l'application directe de la préparation contenant le médicament. Dans ce dernier cas, on constate, en début d'expérience, une rapide montée de la concentration en principe actif dans l'humeur aqueuse artificielle, cette augmentation devenant plus faible et plus constante en fonction du temps dans la suite de l'essai. Nous pensons pouvoir attribuer cette constatation au fait que, par un traitement préalable du tissu, on rend possible le retour de la cornée à un état plus proche des conditions physiologiques⁴¹.

Figure 16

INFLUENCE DU pH ET DU TRAITEMENT PREALABLE :
PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l TAMPON PHOSPHATES



MISHIMA ET HEDBYS⁵⁷, dans leurs expériences "in vitro" sur la perméabilité cornéenne à l'eau, procèdent à un passage de la solution nutritive durant un temps minimal de 20 minutes, pour mettre le tissu en équilibre osmotique avec celle-ci. Dans le même ordre d'idées, BOBERG-ANS ET COLL.⁸⁸ ont déterminé "in vivo" l'influence du traitement de la cornée par une solution tamponnée, préalablement à l'application de mydriatiques.

L'augmentation rapide de la concentration, en début d'expérience, lorsqu'il n'y a pas de traitement par la solution tampon, semble trouver une explication dans les travaux de WEEKERS³⁸; celui-ci a observé que l'abaissement de la résistance électrique favorisait le passage des substances ionisées. Les anesthésiques locaux agissent dans ce sens et augmentent également la perméabilité endothéliale, d'où leur passage plus intense dans l'humeur aqueuse.

La comparaison des résultats avec ceux d'expériences sur la procaine réalisées "in vivo", comme celles de SOEHRING ET COLL.⁴ ou de SWAN ET WHITE³ est malaisée, car les techniques dont ils se servent ne présentent pas de points communs avec notre méthode; de plus, les notions cinétiques n'y sont pas envisagées. Néanmoins, dans l'éventail des conditions appliquées, nous pouvons constater, comme dans nos essais, que les quantités de procaine retrouvées sont d'autant plus élevées que le pH est alcalin.

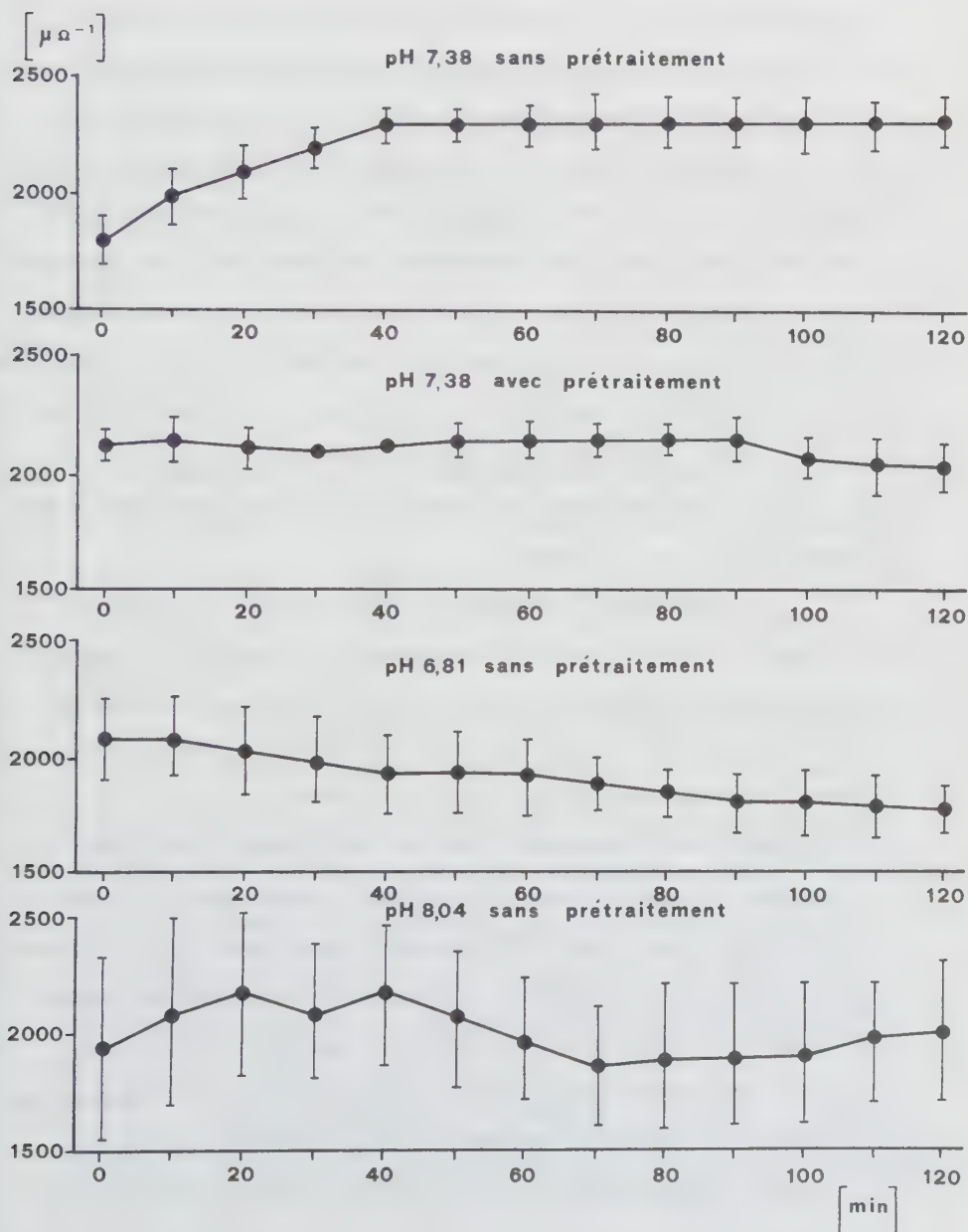
III.2.1.2 Influence de la procaïne et du pH sur la conductivité électrique à travers la cornée et son épaisseur

Les propriétés pharmacologiques de la procaïne¹⁵⁵ laissent prévoir une diminution de la conductivité électrique à travers le tissu auquel ce médicament est appliqué. Expérimentalement, on observe effectivement dans tous les cas un profil de conductivité dont la moyenne des valeurs est inférieure à celle présentée par une solution témoin sans principe actif (Fig. 7). A pH 7,38, sans conditionnement préalable du tissu par la solution tamponnée, la conductivité passe en 40 minutes de 1800 à $2300 \mu\Omega^{-1}$, valeur à laquelle elle se maintient durant le reste de l'expérience, dans les limites de l'écart-type de chaque mesure. Lorsque le médicament n'est appliqué qu'une fois l'état stationnaire atteint, les valeurs de conductivité se maintiennent, dès le début de l'introduction de la procaïne, entre 2000 et $2200 \mu\Omega^{-1}$. Sur une base statistique, on peut admettre que la conductivité demeure constante durant l'expérience. Sa valeur moyenne ne diffère pas de celle observée dans la première série d'expériences. Seule change l'évolution dans le temps (Fig. 17).

Au niveau du pH, on pourrait s'attendre à observer une conductivité d'autant plus importante qu'il est plus faible, c'est à dire que la quantité de forme dissociée, meilleure conductrice, est plus élevée. Pratiquement, on observe le contraire, en particulier à pH 8,04.

Figure 17

PROFILS DE CONDUCTIVITE: PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l TAMPON
PHOSPHATES



La conductivité y est beaucoup plus élevée qu'aux autres valeurs. Dans nos conditions expérimentales et en relation avec les données fournies par les essais histologiques, nous pensons pouvoir donner à ces constatations l'explication suivante: un pH plus alcalin apparaît plus toxique pour l'endothélium, y entraînant une perte momentanée de l'organisation membranaire, plus lente à disparaître que les troubles superficiels (oedèmes limités réversibles) constatés au niveau de l'épithélium. Le rôle important de l'endothélium, dans les phénomènes de transport des électrolytes, directement liés aux paramètres électriques, expliquerait que ce tissu devienne plus perméable, si des lésions au niveau submicroscopique s'y produisent. En revanche, un pH plus acide n'affecte que faiblement les tissus, d'où les différences modérées de conductivité existant entre les essais à pH 7,38 et 6,81.

L'épaisseur cornéenne reste stable ou augmente faiblement pendant la durée des essais. Une fois la cornée montée dans le système de perfusion, l'épaisseur moyenne ne diffère pas de celle observée "in situ", après prélèvement de la tête du lapin. Une plus grande stabilité de cette épaisseur est constatée lors du traitement préalable de la cornée par une solution tamponnée. Comme pour la conductivité électrique, les différences d'une condition à l'autre ne sont pas significatives. L'épaisseur observée se situe dans tous les cas entre les valeurs extrêmes de 0,39 et 0,45 mm (moyenne de trois mesures successives et lecture de la valeur sur la table de correction, en fonction de la courbure). Comparativement aux valeurs mentionnées par la

plupart des auteurs, nous pouvons considérer celles mesurées dans nos essais comme "physiologiques". De plus, dans nos conditions expérimentales, aucun dégât aux tissus n'apparaît à l'examen microscopique.

III.2.1.3 Influence des tensio-actifs

Les Tween^R 20 (Fig. 18) et 80 (Fig. 19) ont été ajoutées aux solutions de procaïne en concentrations proches de la CMC et beaucoup plus élevées que cette dernière (Tableau 5).

A pH 7,38, on observe une augmentation de la vitesse de transport à toutes les concentrations en Tween^R. Lorsque celles-ci sont proches de la CMC (environ 0,01 %), la différence avec le témoin demeure faible. C'est le Tween^R 20 qui montre l'effet le plus marqué. Cette constatation rejoint celles de MARSH ET COLL.⁶⁵ pour l'expérimentation "in vivo" chez l'homme et de REISER¹⁵⁵ pour ce qui est des essais chez le lapin.

Les relations entre la quantité de médicament retrouvée dans la chambre antérieure et la valeur HLB du tensio-actif ne peuvent être exprimées que par un ordre de grandeur et non par une valeur précise. Selon les auteurs cités ci-dessus, on constate une augmentation mesurable de la vitesse de transport dans un intervalle optimal de HLB situé entre 15 et 17, valeurs correspondant aux caractéristiques des Tween^R employés.

L'action sur la vitesse de transport s'expliquerait par l'effet du tensio-actif sur la membrane elle-même,

au niveau des couches superficielles de l'épithélium, rendues momentanément plus perméables par un phénomène réversible de "toxicité". Selon ROUFFIAC⁹⁴, une interaction entre le principe actif et l'adjuvant paraît exclue. L'effet solubilisant exercé par le Tween^R ne saurait guère être mis en cause, le chlorhydrate de procaïne ayant lui-même une solubilité élevée dans l'eau. La miscibilité avec la pellicule lacrymale ne peut, "in vitro", être étudiée comme cause éventuelle de l'augmentation du transport, toute la face antérieure de la cornée étant baignée par une préparation homogène.

Figure 18

INFLUENCE DU TWEEN^R 20: PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l
TAMPON PHOSPHATES

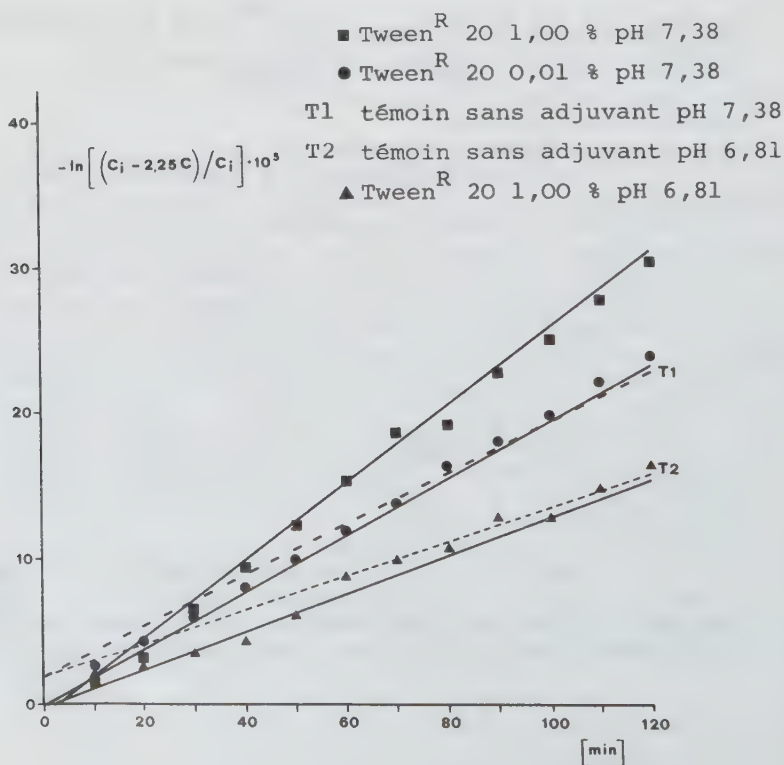
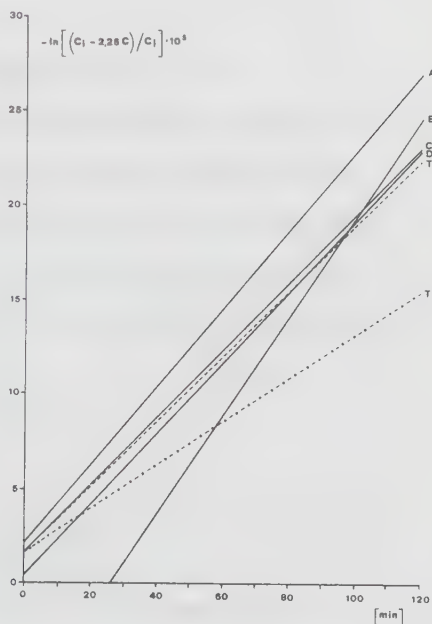


Figure 19

INFLUENCE DU TWEEN^R 80: PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l
TAMPON PHOSPHATES

- A Tween^R 80 1,00 % pH 7,38
- B Tween^R 80 0,10 % pH 7,38
- C Tween^R 80 0,01 % pH 7,38
- D Tween^R 80 1,00 % pH 6,81
- T1 témoin sans adjuvant pH 7,38
- T2 témoin sans adjuvant pH 6,81



A pH 6,81, seule une concentration de 1 % de chacun des deux Tween^R a donné lieu à des essais. L'un et l'autre augmentent la vitesse de passage de la procaine. La raison pour laquelle le Tween^R 80 a une action faiblement supérieure à celle du Tween^R 20 paraît surtout liée à la valeur du pH, dans son action propre et indépendante du principe actif sur la perméabilité cornéenne. Une analyse de variance, portant sur les quantités de procaine présentes dans le milieu récepteur en fin d'expérience, montre l'existence d'une interaction entre valeurs du pH et action des Tween^R ($p = 0,05$). La nature de cette interaction s'explique

difficilement par des notions physico-chimiques, certains mécanismes, probablement très complexes, n'étant pas élucidés, tant dans le domaine de la physiologie cornéenne que dans celui du mode d'action des tensio-actifs sur la cornée.

Les tensio-actifs ioniques sont les plus utilisés comme adjuvants dans les préparations ophtalmiques, à cause de leur pouvoir antibactérien. Bien que chimiquement différents de la catégorie précédente, ils interviennent vraisemblablement dans le transport du médicament selon des modalités semblables à celles rencontrées avec les agents non ioniques.

Selon MIKKELSON¹⁵⁶, ils pourraient agir d'une part en diminuant l'importance de la barrière épithéliale hydrophobe, d'autre part en inhibant compétitivement une liaison entre les protéines du tissu cornéen et la molécule médicamenteuse. De plus, ils réduiraient le niveau élevé de la sélectivité épithéliale.

Aux valeurs de pH choisies de 7,38 (Fig. 20) et de 6,81 (Fig. 21), nous avons utilisé le chlorure de benzalkonium et le chlorure de cétypyridinium comme agents cationiques et l'oléate de sodium (Fig. 22) comme produit anionique. Les vitesses de transport ne diffèrent pas, que la concentration en benzalkonium soit de 0,01 ou de 0,1 %. Cette constatation nous amène à penser qu'une saturation du tissu interviendrait dès la plus faible de ces deux concentrations. En augmentant la quantité d'adjuvant, on n'agit plus sur le transport.

L'interprétation de ces résultats en relation avec la CMC est difficile, des valeurs très variables pour les tensio-actifs cationiques étant fournies par les tables¹⁵⁹ qui groupent les déterminations de différents auteurs.

Le cétalpyridinium exerce, à pH 7,38, un effet positif moins intense que le benzalkonium sur la vitesse de transport. A pH 6,81, on ne constate, à concentrations égales, pas de différence entre les deux produits. Une analyse de variance démontre ($p = 0,05$) l'existence d'une interaction entre l'effet de ces tensio-actifs et la valeur de pH à laquelle ils sont appliqués.

Figure 20

INFLUENCE DES TENSIO-ACTIFS CATIONIQUES A pH 7,38:
PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l TAMPON PHOSPHATES

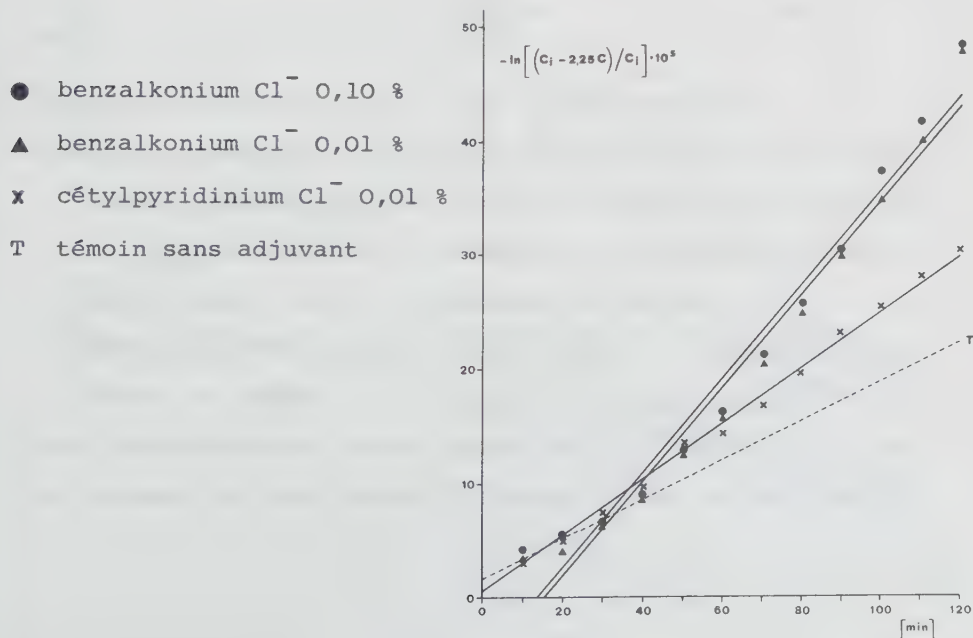
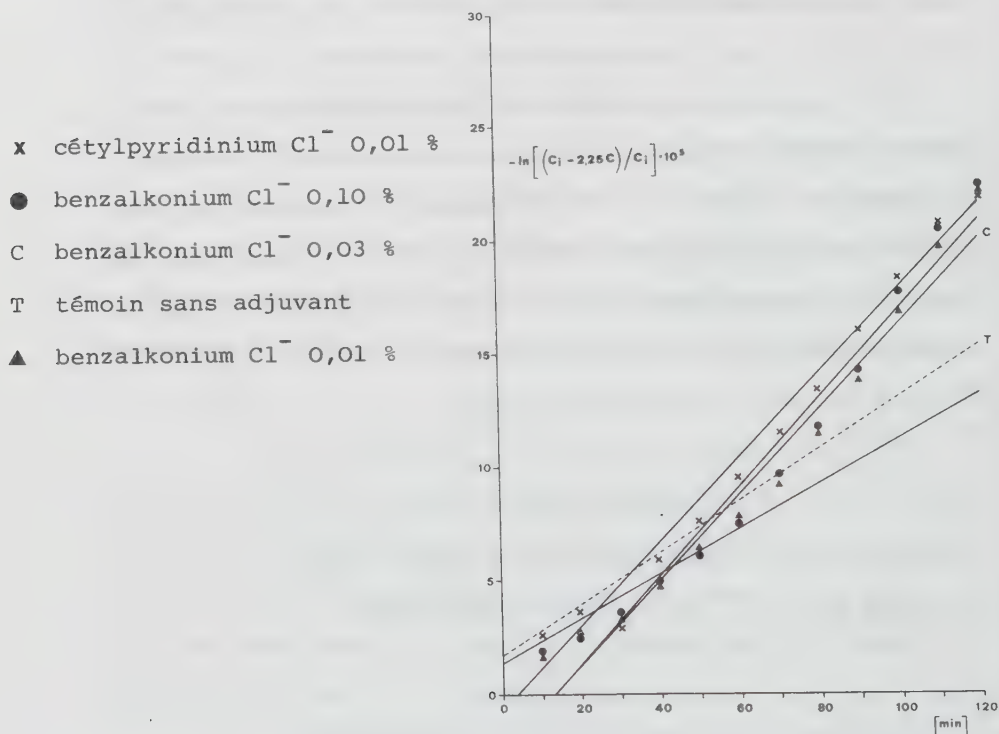


Figure 21

INFLUENCE DES TENSIO-ACTIFS CATIONIQUES A pH 6,81:
 PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l TAMPON PHOSPHATES



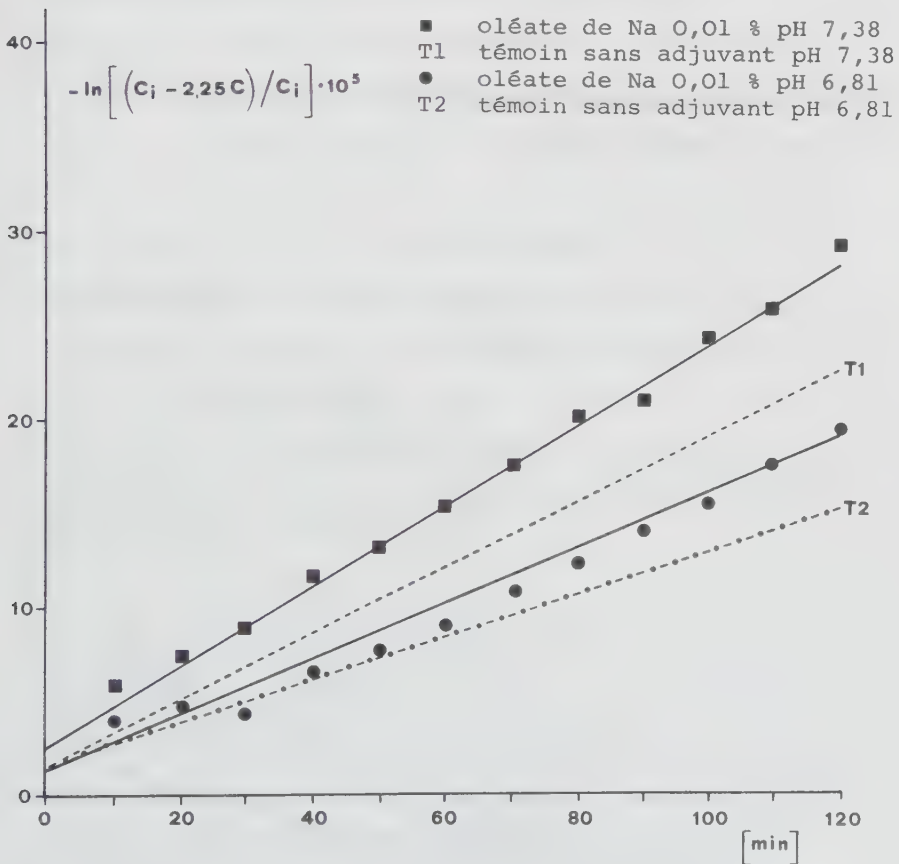
Une concentration de 0,01 % en oléate de sodium, tant à pH 7,38 qu'à pH 6,81, agit plus faiblement que les produits cationiques. Là encore, une interaction existe entre la présence de l'adjuvant et la valeur du pH.

En résumé, on constate une action plus intense des tensio-actifs ioniques et en premier lieu cationiques, que celle des agents non ioniques. Les études "in vivo" consultées^{3,63,121} notent toutes cette même hiérarchie dans la capacité des tensio-actifs d'influer sur la perméabilité

cornéenne. Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude "in vitro" en la matière.

Figure 22

INFLUENCE DE L'OLEATE DE SODIUM: PROCAINE-HCl 10^{-2} mol/l
TAMPON PHOSPHATES

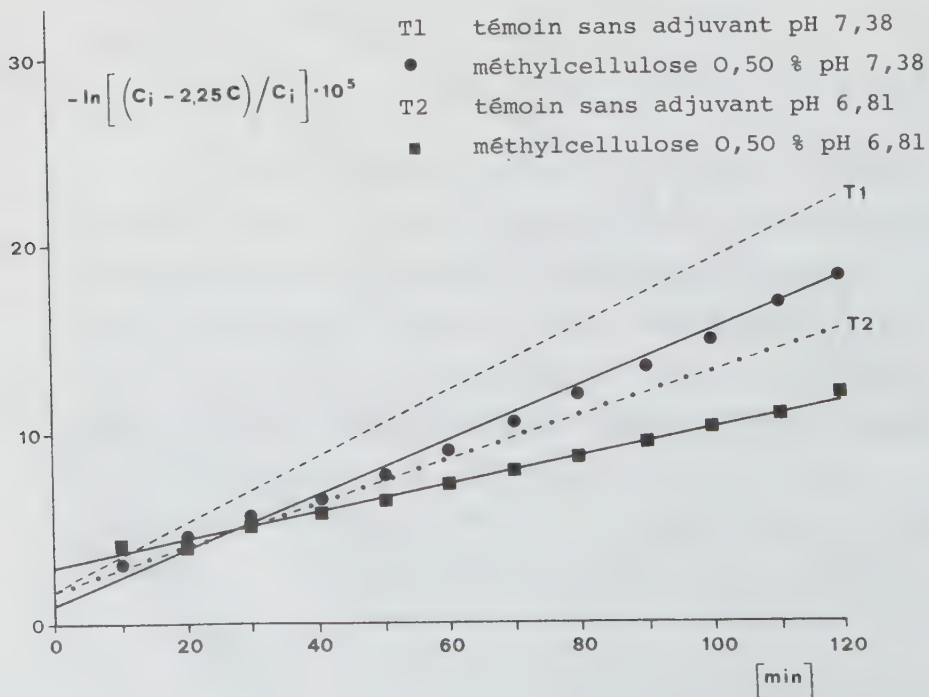


III.2.1.4 Influence de la méthylcellulose

A pH 7,38 comme à pH 6,81, la méthylcellulose (Fig. 23) abaisse la vitesse de transport (rapport R inférieur à l'unité). Une interaction entre la procaine et l'adjuvant peut expliquer l'influence de ce dernier. Il en résulterait une modification de l'activité pharmacologique. NATH ET COLL.¹⁵¹ ont montré, "in vitro" et avec des membranes artificielles, l'action de la méthylcellulose sur la libération du chlorhydrate de procaine. Ils en attribuent le ralentissement à la formation d'un complexe macromolécule/médicament.

Figure 23

INFLUENCE DE LA METHYLCELLULOSE 4000 cP: PROCAINE-HCl
10⁻² mol/l TAMPON PHOSPHATES



La liaison entre procaïne et méthylcellulose est particulièrement marquée, alors que la carboxyméthylcellulose n'agit pas sur la disponibilité du principe actif. Plus que la viscosité de la solution, limitée dans ses effets et pouvant intervenir pour des produits comme l'atropine, qui ne se combine pas à la méthylcellulose, c'est ici un phénomène d'ordre chimique qui entre en considération pour expliquer le mode d'action de l'adjuvant.

III.2.1.5 Influence des adjuvants sur la conductivité à travers la cornée et son épaisseur

Dans l'ensemble, les adjuvants ne modifient que peu la conductivité à travers la cornée, comparativement à celle mesurée pour des préparations ne contenant que de la procaïne en solution tamponnée.

Aux deux valeurs de pH où ont eu lieu les essais, les Tween^R 20 et 80 ont une action régulatrice sur la conductivité qui demeure constante en fonction du temps ($p = 0,05$).

Avec les agents cationiques, le profil est d'autant plus régulier que leur concentration est élevée, tout en ne s'éloignant que faiblement des valeurs d'une préparation de référence. Une lente croissance des valeurs mesurées est constatée à pH 6,81. Seul l'oléate de sodium entraîne une augmentation marquée de la conductivité, en particulier à pH 7,38 (Fig. 24).

Les tensio-actifs, quel que soit leur type, ne font varier l'épaisseur cornéenne que dans les limites des

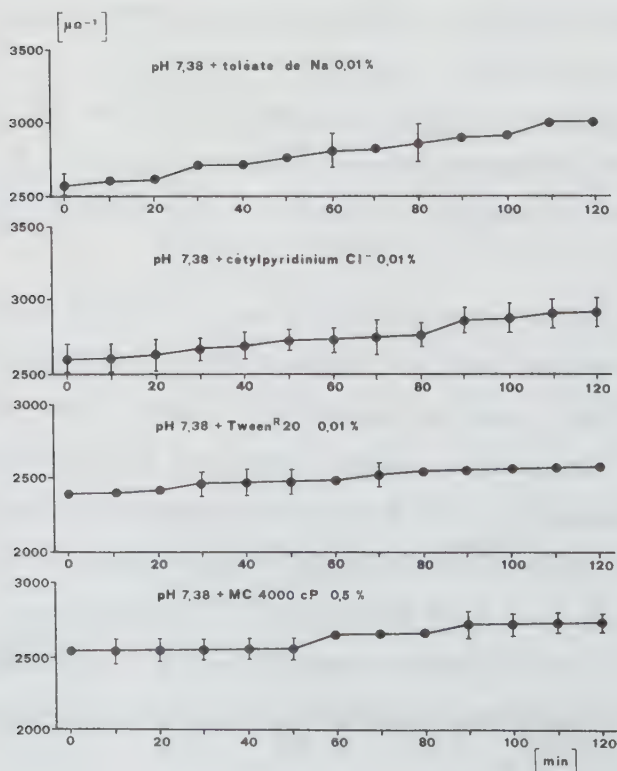
écarts de mesure constatés pour un témoin sans adjuvant.

Il n'existe pas de corrélation entre les changements de l'épaisseur cornéenne et ceux de la conductivité ou de la vitesse de transport.

En présence de méthylcellulose, la conductivité électrique reste constante, au même niveau moyen de $2500\mu\Omega^{-1}$ qu'une préparation de même pH sans adjuvant. L'épaisseur de la cornée demeure, quant à elle, dans des limites physiologiques.

Figure 24

INFLUENCE DES ADJUVANTS SUR LA CONDUCTIVITE: PROCAINE-HCl
 10^{-2} mol/l TAMPON PHOSPHATES



T a b l e a u 6

Résultats expérimentaux

Abréviations

OLE = oléate de Na

BZA = benzalkonium Cl^-

CET = cétypyridinium Cl^-

T20 = Tween^R 20

T80 = Tween^R 80

MEC = méthylcellulose 4000 cP

La concentration des adjuvants est

donnée en poids / volume %

Procaine-HCl 10^{-2} mol / l, dans le tampon phosphates selon HIND ET GOYAN⁷⁵

CONDITIONS	$P \times 10^9$ [cm sec ⁻¹] (a)	Pente b $\times 10^8$ [mol sec ⁻¹] (a)	Variance sur la pente S_b $\times 10^{17}$ (b)	R (b)	% C _i (c)	Conducti- vité moyenne [$\mu\Omega^{-1}$]	s	Epaisseur moyenne [mm]	s
pH 8,04	1,22	6,42	1,49	---	0,82	3572	80	0,43	0,02
pH 7,38	0,56	2,97	0,07	---	0,39	2216	158	0,43	0,01
pH 7,38 traitement préalable	0,42	2,43	0,13	---	0,28	2115	33	0,39	0,01
pH 6,81	0,36	1,90	0,07	---	0,27	1919	93	0,43	0,01

T a b l e a u 6 (suite)

CONDITIONS	$P \times 10^9$ [cm sec ⁻¹] (a)	Pente b $\times 10^8$ [mol sec ⁻¹] (a)	Variance sur la pente S_b $\times 10^{17}$	R (b)	% C_i (c)	Conducti- vité moyenne [$\mu\Omega^{-1}$]	s	Epaisseur moyenne [mm]	s
pH 7,38 + OLE 0,01 %	0,67	3,60	5,16	1,76	0,51	2781	148	0,42	0,02
pH 6,81 + OLE 0,01 %	0,43	2,28	9,72	1,20	0,33	2140	75	0,43	0,01
pH 7,38 + BZA 0,01 %	1,30	6,82	16,65	2,30	0,85	2135	136	0,43	0,01
pH 7,38 + BZA 0,10 %	1,32	6,29	10,74	2,33	0,85	2415	95	0,43	0,01
pH 6,81 + BZA 0,01 %	0,60	3,09	4,50	1,67	0,39	2480	102	0,44	0,01
pH 6,81 + BZA 0,10 %	0,59	3,12	4,72	1,65	0,39	2231	167	0,43	0,01
pH 7,38 + CET 0,01 %	0,79	4,28	0,90	1,41	0,54	2742	111	0,42	0,01
pH 6,81 + CET 0,01 %	0,58	3,04	1,65	1,60	0,39	2669	147	0,43	0,01
pH 7,38 + T2O 0,01 %	0,62	3,25	0,20	1,10	0,42	2454	43	0,43	0,01
pH 7,38 + T2O 1,00 %	0,82	4,44	1,00	1,46	0,54	2654	88	0,42	0,01
pH 6,81 + T2O 1,00 %	0,40	2,17	0,86	1,12	0,28	2331	107	0,42	0,01
pH 7,38 + T8O 0,01 %	0,59	3,13	0,22	1,05	0,39	2125	74	0,43	0,01
pH 7,38 + T8O 0,10 %	0,84	2,44	41,88	1,48	0,41	2452	82	0,42	0,01
pH 7,38 + T8O 1,00 %	0,64	3,47	1,27	1,79	0,47	3115	79	0,42	0,01
pH 6,81 + T8O 1,00 %	0,53	2,86	0,20	1,47	0,39	2396	97	0,42	0,02
pH 7,38 + MEC 0,50 %	0,42	2,30	0,41	0,74	0,32	2582	50	0,41	0,01
pH 6,81 + MEC 0,50 %	0,23	1,23	0,06	0,65	0,20	2154	57	0,43	0,01

(a) coefficient de perméabilité apparent

(b) rapport entre vitesses de transport avec et sans adjuvant

(c) % de la concentration appliquée retrouvé dans l'humeur aqueuse artificielle

T a b l e a u 6 bis

Expériences comparées 2 à 2 par le test de t de Student

Formulations de la procaine-HCl 10^{-2} mol / l

1	pH 8,04	12	pH 6,81 + CET 0,01 %
2	pH 7,38	13	pH 7,38 + T20 0,01 %
3	pH 7,38, traitement préalable	14	pH 7,38 + T20 1,00 %
4	pH 6,81	15	pH 6,81 + T20 1,00 %
5	pH 7,38 + OLE 0,01 %	16	pH 7,38 + T80 0,01 %
6	pH 6,81 + OLE 0,01 %	17	pH 7,38 + T80 0,10 %
7	pH 7,38 + BZA 0,01 %	18	pH 7,38 + T80 1,00 %
8	pH 7,38 + BZA 0,10 %	19	pH 6,81 + T80 1,00 %
9	pH 6,81 + BZA 0,01 %	20	pH 7,38 + MEC 0,50 %
10	pH 6,81 + BZA 0,10 %	21	pH 6,81 + MEC 0,50 %
11	pH 7,38 + CET 0,01 %		

Légende

- + valeur significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ $p = 0,05$
- ++ valeur très significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ $p = 0,01$
- o valeur non significative si $t_{\text{calc.}} < t_{\text{table}}$ $p = 0,05$

T a b l e a u 6 b i s (suite)

[illegible]

III.3 Transport de l'éphédrine

Nous n'avons utilisé cette substance que dans deux essais de mise au point du modèle. Le chlorhydrate d'éphédrine en solution non tamponnée isocryoscopique a été testé d'une part après traitement de la cornée avec une solution de NaCl à 0,9 %, d'autre part, appliqué aussitôt après le montage du tissu.

Les résultats expérimentaux permettent de tirer les mêmes conclusions qu'avec la procaïne. L'introduction immédiate de la préparation médicamenteuse entraîne une rapide augmentation de la concentration en éphédrine dans l'humeur aqueuse artificielle, au début de l'essai.

Le médicament s'applique, dans ce cas, à un tissu non encore adapté aux nouvelles conditions auxquelles on le soumet. La cornée se trouve alors, comme c'était le cas pour les essais avec la procaïne, présenter une plus grande perméabilité.

En revanche, le traitement préalable avec le véhicule jusqu'à établissement d'un équilibre avec le milieu, assure un passage régulier de l'éphédrine à travers la cornée. La pente de la droite qui décrit l'augmentation de la concentration en fonction du temps est alors constante dès le début de l'essai (Fig. 25 et tableau 7).

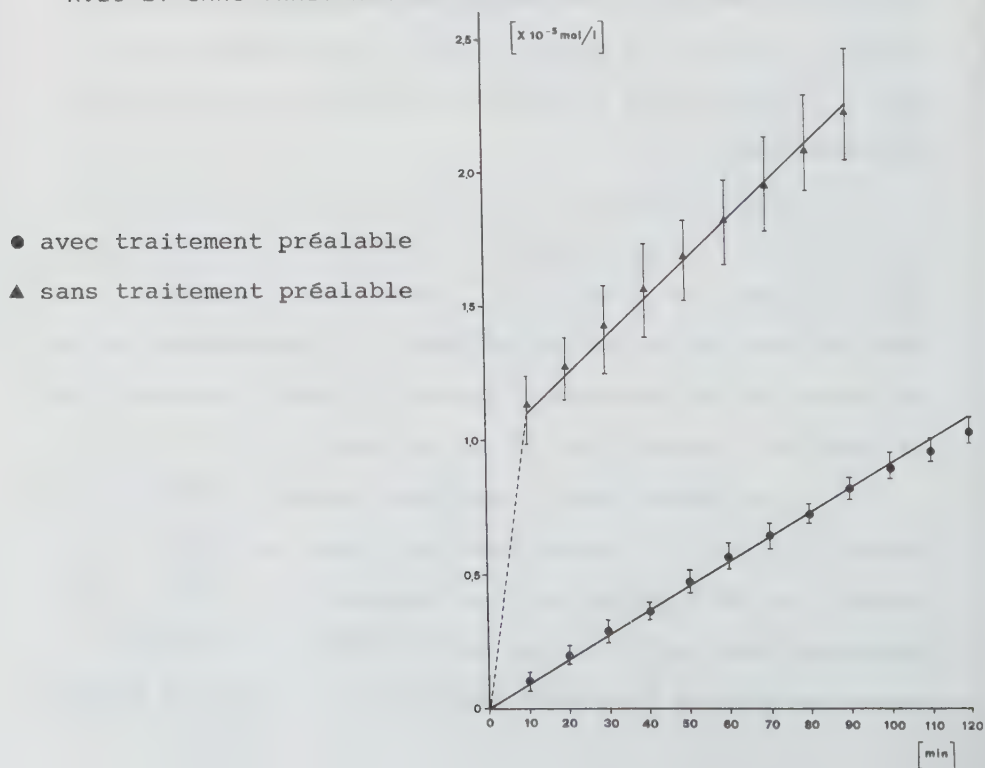
La conductivité électrique moyenne diffère également d'un cas à l'autre. Sans traitement préalable de la cornée, ses variations sont plus marquées que dans le cas contraire. Avec un tissu non conditionné, la conductivité passe, du début à la fin de l'expérience, de 2010 à $2620 \mu\Omega^{-1}$.

Elle ne varie pas si l'on opère dans des conditions stabilisées.

Il paraît difficile d'invoquer ici les propriétés pharmacologiques de l'éphédrine pour expliquer les observations réalisées. Nous ne disposons pas, comme pour la procaïne, de références pouvant s'appliquer à nos constatations expérimentales. Nous ne pouvons retenir que la notion générale, valable a priori pour l'ensemble des médicaments susceptibles de passer la cornée, selon laquelle celle-ci est plus perméable durant le temps qu'elle met à s'adapter à son nouveau milieu. Cette conclusion tient compte, notamment, des observations de MISHIMA ET COLL.⁵⁷.

Figure 25

TRANSPORT DE L'EPHEDRINE-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l DANS NaCl 0,9 %
AVEC ET SANS TRAITEMENT PREALABLE DE LA CORNEE



T a b l e a u 7

Résultats expérimentaux avec et sans prétraitement

Ephédrine-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ mol / l dans NaCl 0,9 %

CONDITIONS	$P \times 10^8$ [cm. sec ⁻¹]*	Pente b $\times 10^6$ [mol. sec ⁻¹]	Variance sur la pente S_b $\times 10^{15}$	% C_i^{**}	Conducti- vité moyenne [$\mu\Omega^{-1}$]	s	Epaisseur moyenne [mm]	s
Sans traitement préalable	1,81	1,02	3,97	1,86	2384	194	-----	---
Avec traitement préalable	1,14	0,64	0,93	0,66	2505	29	0,40	0

* coefficient de perméabilité apparent

** % de la concentration appliquée retrouvé dans l'humeur aqueuse artificielle

Comparaison entre les pentes des droites par le test de t de Student

$t_{calc.} = 12,75$	$t_{0,05}^{(17)} = 2,11$	L'hypothèse de parallélisme est rejetée, les
	$t_{0,01}^{(17)} = 2,90$	pentres sont significativement différentes.

III.4 Transport de l'oxyphenbutazone

L'oxyphenbutazone (= OPB, Tandéril^R), bien qu'elle soit utilisée le plus souvent par voie générale, offre un intérêt particulier en application ophtalmique topique. Elle peut représenter une alternative à la thérapeutique anti-inflammatoire par les corticostéroïdes. L'OPB trouve une application importante dans le traitement des inflammations uvéales.

La formulation de préparations à base d'OPB pose des problèmes dus à sa très faible solubilité et à sa stabilité limitée en solution. La seule forme utilisée en pratique est la pommade à teneur élevée (10 %) en OPB, pour assurer une concentration efficace au site d'action de la molécule¹⁵⁹. Nos constatations expérimentales montreront que la voie de pénétration du médicament dans les structures oculaires revêt, en l'occurrence, toute son importance.

Seuls des adjuvants tensio-actifs non ioniques (Tween^R 20 et 80) ainsi que la méthylcellulose ont été employés. Une incompatibilité chimique entraîne, en effet, la formation d'un précipité à l'adjonction d'agents ioniques.

Sans apporter de changement au protocole d'expérience décrit dans la deuxième partie du travail, nous avons adopté la variante comportant le traitement de la cornée par le véhicule seul, avant l'application de la préparation médicamenteuse.

Parmi toutes les conditions expérimentales choisies (Tableau 8), aucune n'a permis de déceler la présence

d'oxyphenbutazone dans l'humeur aqueuse artificielle, malgré une excellente sensibilité de la méthode de dosage en ultraviolet ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 900$) dans le milieu de perfusion.

T a b l e a u 8

Conditions de formulation de l'oxyphenbutazone

Essais sans adjuvants
En solution, à une concentration en OPB de 10^{-3} mol / l, à pH 6,24, 6,81, 7,38, 8,00, 8,70.
En suspension, à pH 7,38, aux concentrations de: $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $5 \cdot 10^{-2}$ et 10^{-1} mol / l.
Adjuvants à pH 7,38 (concentration: poids / vol %)
OPB 10^{-3} mol / l + Tween ^R 20 0,01 et 0,10 % (solutions)
OPB 10^{-3} mol / l + Tween ^R 80 0,01 et 0,10 % (solutions)
OPB 10^{-2} mol / l + Tween ^R 20 0,10 % (solution micellaire)
OPB 10^{-2} mol / l + Tween ^R 80 0,10 % (solution micellaire)
OPB 10^{-2} mol / l + méthylcellulose 4000 cP 1 % (gel)
OPB $5 \cdot 10^{-2}$ mol / l + Tween ^R 20 0,01 et 0,10 % (suspensions)
OPB $5 \cdot 10^{-2}$ mol / l + Tween ^R 80 0,01 et 0,10 % (suspensions)

L'application d'une technique colorimétrique a montré une moins bonne sensibilité et n'a donc pas été retenue. S'il n'a pas été possible de retrouver de l'OPB dans le milieu récepteur, nous avons, en revanche, pu en déceler la présence dans la cornée, grâce à un traitement analytique approprié (Tableau 9).

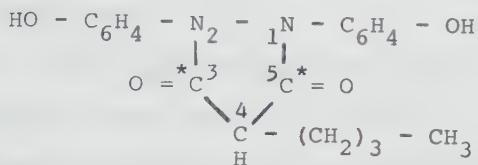
Les faibles pics observés à la longueur d'onde de mesure n'étaient pas dus à l'OPB, mais à des produits insolubles ou faiblement solubles relâchés par la cornée. Ces pics disparaissent lorsque la solution est filtrée sur membrane Millipore^R (diamètre des pores 0,22 μ m) avant la mesure spectrophotométrique.

Pour vérifier ces constatations sur des bases plus larges, nous avons effectué des essais avec une pommade à 10 % d'OPB en suspension. Nous avons choisi un excipient simple (Unguentum ophtalmicum Ph. Helv. VI) pour éliminer d'éventuels artéfacts dus à la formulation. La préparation commerciale contenant un agent conservateur susceptible d'interférer avec le dosage de l'OPB, elle n'a pas été retenue.

Le protocole décrit dans la deuxième partie du travail a été appliqué en utilisant 1,0 g de pommade. Un spectre ultraviolet en continu de l'humeur aqueuse artificielle a été pris, pour vérifier l'identité du produit éventuellement dosé. Un pic, dont la hauteur croît faiblement avec le temps, est observé à 220 nm, longueur d'onde qui ne correspond pas à un maximum d'absorption de l'OPB. Toutes les mesures ayant eu lieu sur un milieu récepteur

filtré, nous en concluons qu'il s'agit d'impuretés dissoutes provenant de l'excipient. Cette constatation s'est confirmée en testant le véhicule seul. Le même pic à 220 nm apparaît sur le spectre.

Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons procédé à une série d'essais avec de l'OPB marquée au ^{14}C , sur les atomes des groupements carboxyliques. Selon STIERLIN ET COLL.⁷⁸, ce marquage est stable du point de vue métabolique.



La courbe d'étalonnage de l'OPB dans le milieu de perfusion a été établie. Pour ce faire et pour le déroulement de l'expérience proprement dite, le produit radioactif est dilué dans de l'OPB non marquée, selon le schéma suivant:

- OPB disponible: 9,80 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.
- Dilution à 1 % dans de l'OPB non radioactive en solution dans le méthanol. Le solvant est évaporé à sec par un courant d'azote dispensé au moyen d'un capillaire, à la surface de la solution contenue dans un tube à essai.
- Dilution de l'OPB destinée aux essais: 0,0980 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; dissolution de 3,25 mg de cette dilution dans 10 ml de milieu de perfusion.

- Solution pour l'étalonnage: 0,0319 μ Ci/ml; prélèvements de 0,1 à 0,5 ml et ajustement du volume à 0,5 ml par du milieu de perfusion. A chaque échantillon, on ajoute 10 ml de mélange de scintillation (toluène 1 l, dioxane 1 l, méthanol 0,6 l, naphthalène 208,00 g, PPO 13,00 g, POPOP 0,26 g). L'activité est mesurée au compteur à scintillation par trois cycles comportant un comptage de 10 minutes par échantillon.

L'essai est préparé selon le protocole habituel. Il a lieu en circuit ouvert, c'est à dire avec un milieu constamment renouvelé.

20 ml de solution, contenant 65 mg/ 100 ml d'OPB totale dans le tampon phosphate à pH 7,38, ont été appliqués à la surface de la cornée, soit une quantité totale de 13 mg d'OPB. La chronologie de l'expérience s'établit comme suit:

- | | Temps [min] | |
|-----|-------------|--|
| - | 30 | Mise en place de la cornée dans la cellule et traitement préalable du tissu avec le véhicule de la préparation seul. |
| | 0 | Elimination de la solution de conditionnement et remplacement par la préparation à base d'OPB ^{14}C . |
| + | 10 | De 10 en 10 minutes, prélèvement de 0,1 ml de |
| à + | 120 | milieu de perfusion dans le flacon récepteur. |
| + | 120 | Arrêt de l'expérience, prélèvement de 0,1 ml de la solution de départ (contrôle de la diminution de l'activité) élimination de la solution radioactive et démontage du support de la cornée. |

Cette dernière est rincée à cinq reprises dans du milieu de perfusion. Elle est débarrassée de sa bordure de sclérotique. On procède ensuite à sa digestion enzymatique dans 10 ml de Soluène^R Packard, durant 30 minutes à 60°C.

Les prélèvements faits au cours du temps sont additionnés chacun de 10 ml de mélange de scintillation, alors qu'on en ajoute 15 ml à la préparation contenant la cornée digérée. Tous ces échantillons sont soumis au comptage, après 30 minutes de séjour dans le compartiment réfrigéré de l'appareil.

Cette expérience confirme les résultats précédemment acquis. Nous en tirons le bilan suivant: les comptages effectués sur les échantillons prélevés au cours du temps donnent un nombre de coups par minute (CPM) qui ne diffère pas du bruit de fond (background) de l'appareil. Ces valeurs ne reflètent donc aucun passage de l'oxyphenbutazone à partir de la concentration de départ utilisée. Nous avons dosé l'OPB présente dans la cornée à l'aide d'un étalon interne de ¹⁴C toluène (Tableau 9).

Le pK_a de l'OPB est de 4,7, aussi les proportions de forme non dissociée, donc plus aptes à franchir la barrière cornéenne, seront-elles d'autant plus élevées que le pH est bas, puisqu'il s'agit d'un acide faible (calcul selon les équations de Henderson-Hasselbach (6)).

On devrait, dès lors, s'attendre à un passage de l'OPB au moins aux valeurs basses de pH, d'autant plus que, "in vivo", la pénétration dans les structures de l'oeil

est effective. Enfin, l'expérimentation avec un produit radioactif montre la présence du médicament dans la cornée.

pH	% de forme non ionisée
6,24	2,450
6,80	0,790
7,38	0,200
8,00	0,050
8,70	0,001

T a b l e a u 9

Dosage de l'OPB dans la cornée

Quantité d'OPB appliquée	13,0 mg dans 20 ml de tampon phosphates à pH 7,38 (concentration: $2,0 \cdot 10^{-5}$ mol / l
Quantité d'OPB retrouvée après 120 min. d'essai	0,89 mg, soit 6,84 % de la quantité appliquée
Quantité d'OPB présente dans la cornée	19,5 μ g, soit 2,19 % de la quantité consommée durant l'expérience et 0,15 % de la quantité appliquée. Ceci représente 205,48 μ g d'OPB / g de tissu. (Notons, à titre de comparaison, que STIER-LIN ET COLL. (78) trouvent 110 μ g / g de tissu en appliquant "in vivo" 20 mg de pommade à 10 %, soit 2,0 mg d'OPB par application.)

Nous pensons, sur la base de ces données, pouvoir suggérer une explication au fait que, dans nos essais, l'OPB n'est pas décelable dans l'humeur aqueuse artificielle, alors qu'elle pénètre dans l'oeil "in vivo".

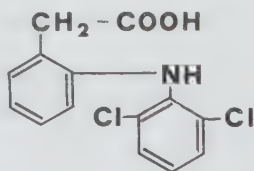
La taille de la molécule ne paraît pas entrer

en ligne de compte, étant du même ordre de grandeur que celle des autres produits étudiés et en particulier du Diclofénac qui, lui, passe la cornée.

Le problème se situe vraisemblablement au niveau de l'épithélium dont la perméabilité à l'OPB doit être effective. En revanche, c'est dans le stroma que le médicament serait retenu, en raison, par exemple, d'une liaison aux protéines. L'épithélium conjonctival étant de même nature que celui de la cornée, le médicament le traverserait pour atteindre la structure richement vascularisée du tissu sous-épithélial, à partir duquel il serait distribué dans tout le globe oculaire. Cette explication se trouve en accord avec l'évolution dans le temps des quantités présentes dans les différentes parties de l'oeil, dans les expériences "in vivo" de STIERLIN ET COLL.⁷⁸.

III.5 Transport du Diclofénac

Produit nouveau parmi les antiinflammatoires non stéroïdiens, le Diclofénac (DCI)¹⁵⁹ (sel sodique de l'acide o - (2,6 dichloranilino) phénylacétique) diffère par sa structure chimique des produits classiques de cette catégorie thérapeutique, comme les salicylés, les dérivés de la pyrazolone ou de l'indène. Déjà utilisé par voie générale et commercialisé sous le nom de Voltarène^R, ce médicament ne connaît pas encore d'indication ophtalmologique. Nous l'avons expérimenté sur la cornée pour déterminer dans quelle mesure il franchissait cette barrière. Du fait qu'il s'agit d'un produit nouveau, nous ne disposons pas d'éléments de comparaison. La valeur de nos résultats concernera donc nos seules conditions expérimentales.



Paramètres et adjuvants étudiés

Nous avons envisagé l'influence des paramètres et adjuvants suivants, dans les conditions que décrit le Tableau 10, ci-dessous:

- concentration
- pH

- force ionique
- hydroxypropylméthylcellulose 60 HG
- Tween^R 80
- nature du tampon et du cation.

Nous n'avons pas pu utiliser de tensio-actifs ioniques, ceux-ci étant incompatibles avec le Diclofénac qu'ils font précipiter.

Contrôles préliminaires

Dans l'ensemble des expériences réalisées, nous avons pu constater le passage du Diclofénac à travers la cornée. Le maximum d'absorption observé en ultraviolet à la longueur d'onde de 275 nm correspond à un maximum du principe actif. Pour confirmer cette constatation, nous avons soumis des échantillons de la solution recueillie à une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM). Les résultats de cette détermination sont comparés à un témoin, préparé en dissolvant le principe actif dans du milieu de perfusion. La CCM a été pratiquée sur Silicagel G 254 avec la phase mobile butanol-eau-pyridine (3 + 2 + 0,5) et les vapeurs d'iode comme révélateur. Les R_f correspondent à ceux de la substance témoin.

III.5.1 Résultats des essais et interprétation

Les différents paramètres envisagés sont examinés successivement, de même que l'effet des adjuvants. Le Tableau 11, à la fin du chapitre III.5, donne une vision globale des résultats.

T a b l e a u 10

Conditions de formulation du Diclofénac

Solutions tampon			
a) Tampons phosphates		b) autres tampons à pH 7,38	
	pH	NaH ₂ PO ₄ mol/l	Na ₂ HPO ₄ mol/l
A1	7,38	0,0132	0,0528
A2	7,38	0,0660	0,0256
A3	7,38	0,0330	0,0128
A4	6,24	0,0528	0,0132
A5	6,81	0,0330	0,0330
A6	8,04	0,0033	0,0637
			B KH ₂ PO ₄ 0,0130 mol/l + Na ₂ HPO ₄ 0,0529 mol/l
			C Na ₂ B ₄ O ₇ 0,005 mol/l + H ₃ BO ₃ 0,180 mol/l
			c) Adjuvants
			T80 Tween ^R 80
			HPMC hydroxypropylméthylcel- lulose 60 HG
Essais sans adjuvants			
No	Diclofénac	pH	tampon
1	1,25 . 10 ⁻³ mol/l	7,38	A1
2	2,50 . 10 ⁻³ mol/l	6,24	A4
3		6,81	A5
4		7,38	A1
5		8,04	A6
6	5,00 . 10 ⁻³ mol/l	6,81	A5
7		7,38	A1
8		7,38	A2
9		7,38	A3
10		7,38	B
11		7,38	C
Essais avec adjuvants: Diclofénac 5,00 . 10 ⁻³ mol/l			
No	Adjuvant	pH	tampon
12	HPMC 2,0 %	6,81	A5
13	HPMC 2,0 %	7,38	A1
14	T80 0,0013 %	7,38	A1
15	T80 0,0130 %	7,38	A1
16	T80 0,5000 %	7,38	A1

Pour obtenir une bonne reproductibilité, tous les essais ont eu lieu après traitement de la cornée par le véhicule, jusqu'à stabilisation de l'épaisseur et des conditions physiologiques.

III.5.1.1 Influence de la concentration

Trois concentrations ont été testées à pH 7,38 et deux à pH 6,81 (tampon phosphates selon HIND ET GOYAN⁷⁵). Il s'agissait de déterminer si une relation existe entre la concentration appliquée, celle retrouvée dans l'humeur aqueuse artificielle et la vitesse de transport. Les valeurs de pH ont été choisies du fait que, tout en se trouvant dans les limites de tolérance de l'oeil, elles assurent un changement suffisamment marqué de la proportion de forme non ionisée du médicament (Fig. 3).

Nous avons affaire à un transport passif, qui peut se décrire par la première loi de Fick. Il a été contrôlé en plaçant de part et d'autre de la cornée du milieu de perfusion contenant du Diclofénac $1,25 \cdot 10^{-3}$ mol/l et en vérifiant que, durant le temps d'expérience de 2 heures, la concentration de part et d'autre du tissu ne varie pas, ce qui est effectivement constaté.

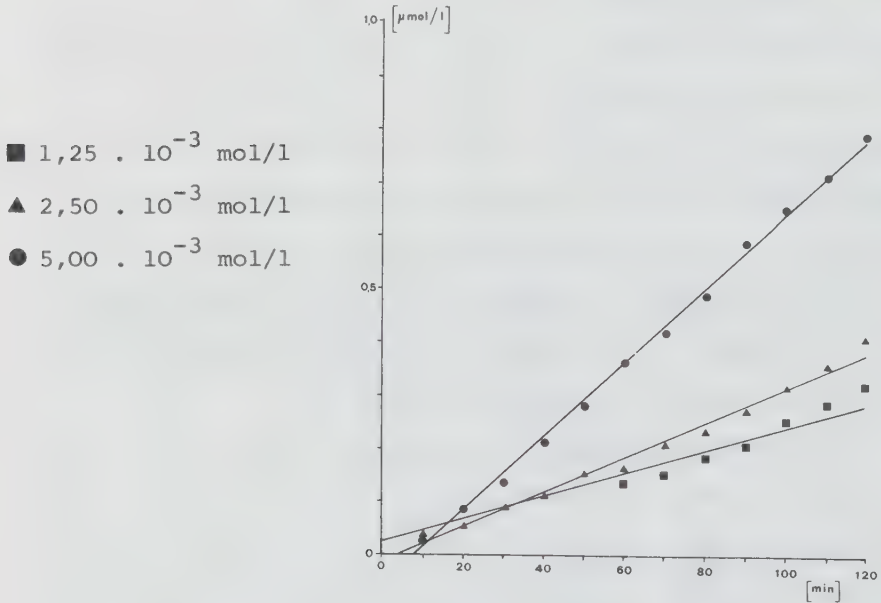
Dans les limites de solubilité du Diclofénac, l'augmentation de sa concentration dans la solution appliquée élève la vitesse de transport et provoque l'augmentation de la quantité retrouvée dans le milieu (Fig. 26).

Dans le choix de concentrations utilisées, on

ne constate pas de valeur de saturation à partir de laquelle la quantité retrouvée dans l'humeur aqueuse n'augmente plus, ce qui confirme le transport passif.

Figure 26

DICLOFENAC: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION



En revanche, la différence est beaucoup plus marquée entre les concentrations de $5,00$ et $2,50 \cdot 10^{-3}$ mol/l qu'entre celles de $2,50$ et de $1,25$ mol/l à pH 7,38. A pH 6,81, la différence est moins prononcée.

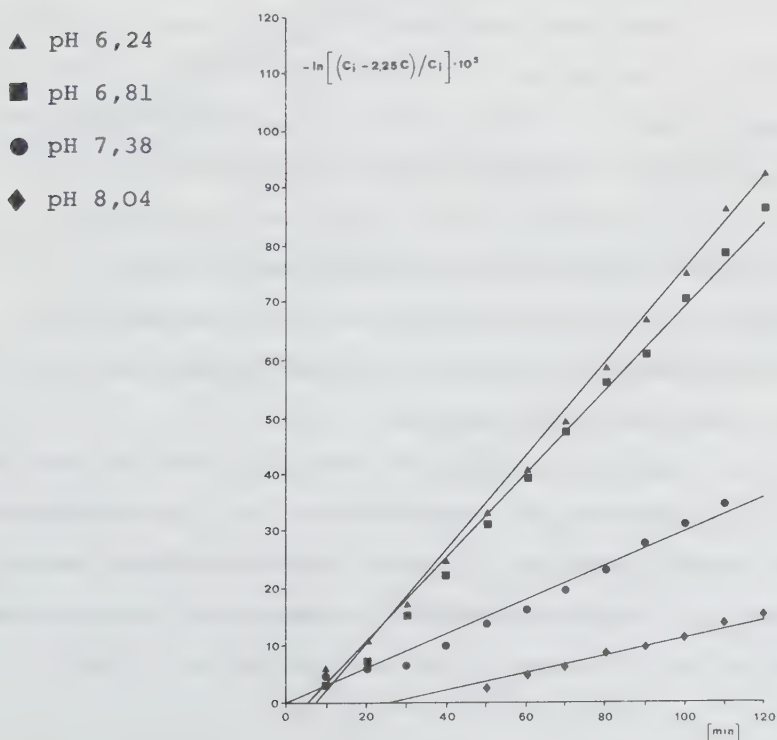
III.5.1.2 Influence du pH

Le fait que le passage d'une molécule à travers la cornée soit fortement conditionné par la proportion de forme non ionisée se vérifie également pour le Diclofénac, dont le pK_a est de 3,9. Il s'agit donc d'un acide faible, dont la dissociation sera d'autant plus importante que le pH du milieu sera plus élevé.

L'expérience montre que le transport est effectivement d'autant plus important que le pH est plus bas, pour la concentration appliquée de $2,50 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Figure 27

DICLOFENAC $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l: INFLUENCE DU pH



A pH 8,04, en particulier, on observe un temps de latence de 30 minutes, avant l'apparition de quantités décelables de Diclofénac dans le milieu récepteur. Cette particularité n'est pas constatée aux autres valeurs de pH. Nous avons ici une illustration du cas opposé à celui de la procaïne, base faible dont le transport est augmenté par un pH élevé.

III.5.1.3 Influence du Tween^R 80

Pour les raisons précédemment mentionnées (incompatibilités), nous avons dû limiter nos essais à un tensio-actif non ionique. Nous avons choisi le Tween^R 80 à des concentrations inférieures, égales et supérieures à sa concentration micellaire critique.

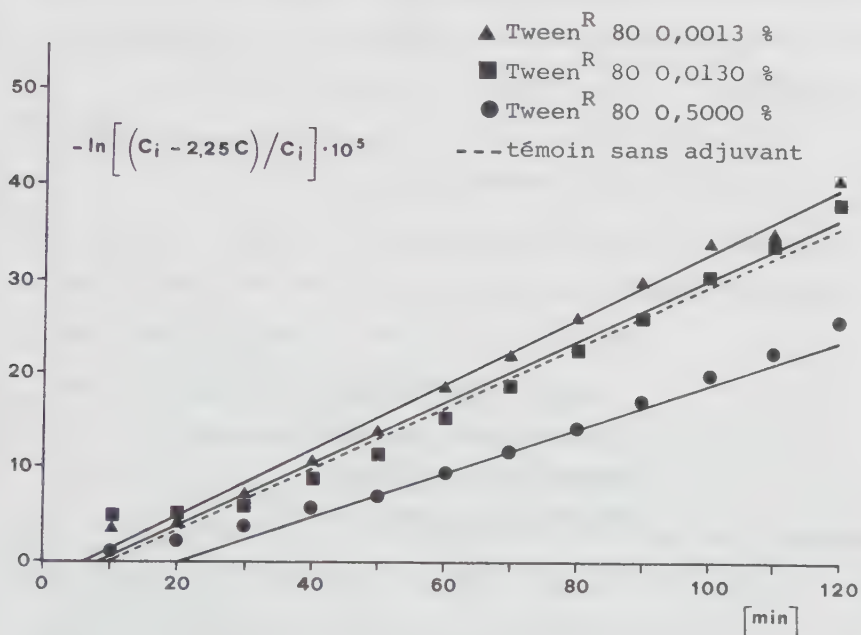
L'expérience nous montre que des concentrations de 0,0013 % (inférieure à la CMC) et de 0,013 % (approximativement égale à la CMC) n'ont qu'une faible influence sur le transport, comparativement à une préparation sans adjuvant. La différence avec le témoin n'est significative que pour la concentration inférieure à la CMC. L'adjonction d'une concentration de 0,50 % en Tween^R 80 freine nettement le transport, en comparaison avec les autres conditions expérimentales.

Plus nettement que ce n'était le cas avec la procaïne, ces observations s'accordent avec les notions théoriques selon lesquelles, à partir et au delà de la CMC, une partie du principe actif est retenue dans les micelles, alors que tel n'est pas le cas au-dessous de la CMC.

Le mode d'action du Tween^R 80 sur la perméabilité réside probablement dans un effet sur la membrane elle-même, plus que dans une interaction avec le médicament¹⁶¹.

Figure 28

DICLOFENAC $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l: INFLUENCE DU TWEEN^R 80



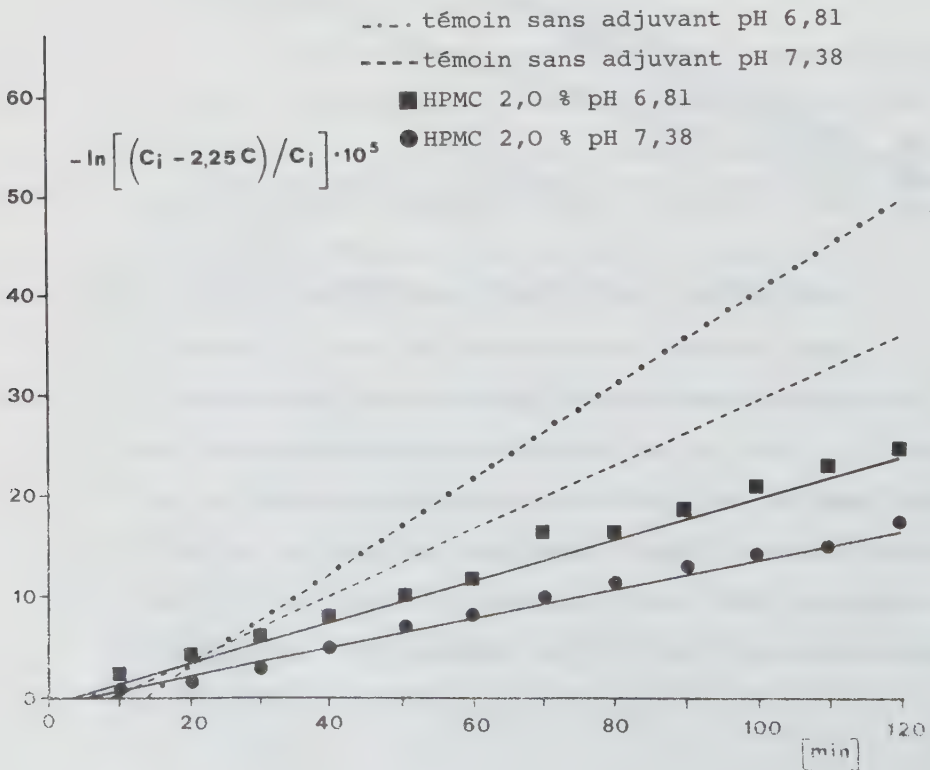
III.5.1.4 Influence de l'hydroxypropylméthylcellulose 60 HG

Cet adjuvant, actuellement le plus couramment utilisé dans les préparations ophtalmiques commerciales en solution, associe des propriétés viscosifiantes et tensio-actives. Dès lors, il doit augmenter le temps de contact avec l'oeil, tout en favorisant la pénétration du principe actif. Nous avons expérimenté l'hydroxypropylméthylcellulose 60 HG (HPMC) à la concentration usuelle de

2 %, sur des préparations à pH 7,38 et 6,81. Dans les deux cas, l'HPMC réduit fortement la vitesse de transport, par rapport à celle observée avec des préparations sans adjuvant. La nature chimique du Diclofénac ne devrait pas favoriser la formation de complexes avec l'adjuvant¹⁶¹. Bien que cela ne soit qu'une hypothèse, il semble que la viscosité joue un grand rôle en ralentissant la libération du médicament.

Figure 29

DICLOFENAC $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l: INFLUENCE DE
L'HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE 60 HG



III.5.1.5 Influence de la nature du tampon et du cation

Nous avons, à pH 7,38, expérimenté trois types différents de tampons, pour estimer leur influence sur le transport. Nous avons utilisé le tampon phosphate qui est celui de la plupart de nos expériences et le même type de tampon, à la même concentration, en remplaçant NaH_2PO_4 par KH_2PO_4 , pour connaître l'influence du cation. Enfin, nous nous sommes servi d'un autre système tampon à base de borax et d'acide borique⁷⁵.

Une concentration en Diclofénac de $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l nous permet de faire les observations suivantes: les différences entre les vitesses de transport obtenues avec les différents tampons sont faibles. Il faut cependant noter que le transport se révèle lui aussi très faible. C'est le tampon phosphate sans potassium qui provoque la vitesse de passage la plus élevée. Le système borax / acide borique freine le passage du Diclofénac, par rapport au précédent. De même, le tampon phosphate contenant du potassium exerce une action inhibitrice encore plus importante qui, selon MAYERSOHN¹⁶¹, peut s'exprimer en %:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \left[1 - \frac{Q_{\text{K}^+}}{Q_{\text{Na}^+}} \right]$$

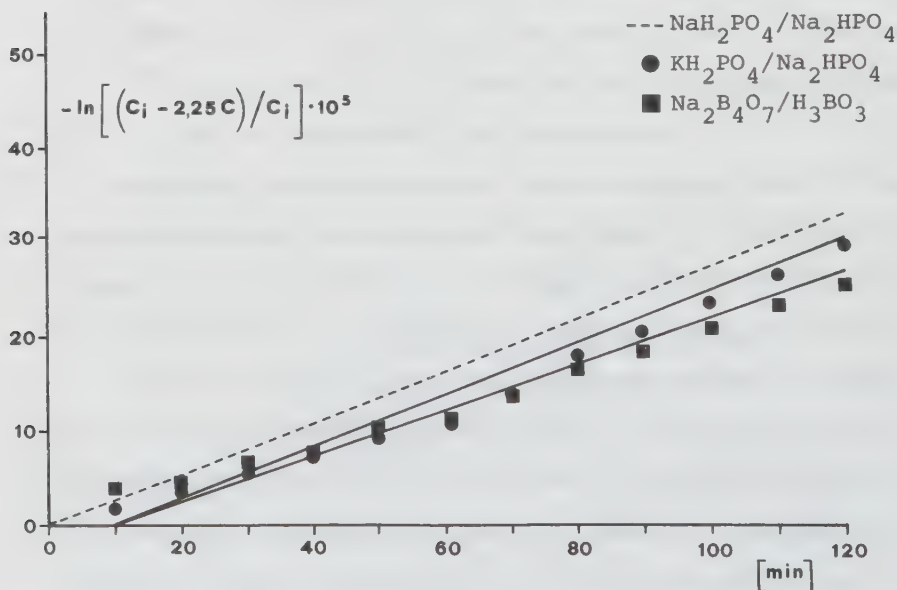
Q_{K^+} et Q_{Na^+} sont les quantités de substance transportées pendant une période donnée, respectivement dans les tampons à base de K^+ et de Na^+ .

Dans l'examen microscopique effectué conjointement avec chaque mesure de concentration, on ne constate pas de gonflement plus prononcé de la cornée sous l'influ-

ence du tampon borax / acide borique ou du tampon à base de potassium (Fig. 30).

Figure 30

DICLOFENAC $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l: INFLUENCE DE LA NATURE DU TAMPON



III.5.1.6 Influence de la force ionique

A pH constant, nous avons préparé des solutions de Diclofénac de concentration constante, mais, par dilution des tampons, de forces ioniques différentes, tout en restant dans les conditions d'isocryscopicit  par adjonction de chlorure de sodium. La quantité de principe actif ne joue qu'un rôle négligeable dans le calcul de

la force ionique. Cette dernière régit l'interaction entre les ions en solution. Nous avons calculé sa valeur au moyen de l'équation:

$$I = 1/2 \sum z^2$$

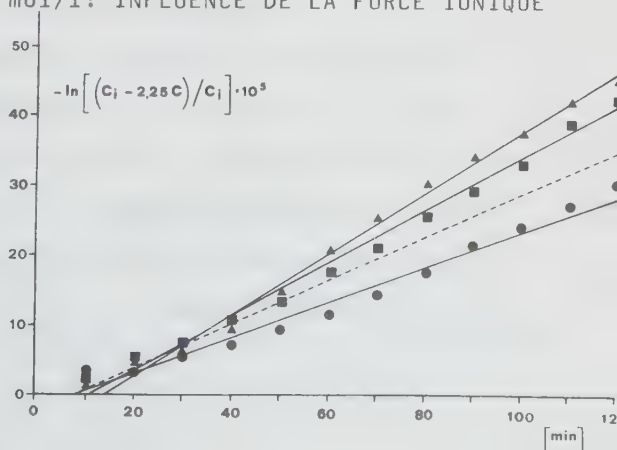
z étant la charge de l'ion.

Nous constatons expérimentalement que le transport du principe actif est d'autant plus important que la valeur de I , c'est-à-dire l'interaction entre les ions en solution, est plus faible. Néanmoins, les écarts entre les différentes forces ioniques n'engendrent pas de changements proportionnels au niveau de la vitesse de transport et de la quantité de Diclofénac retrouvée dans l'humeur aqueuse artificielle. Il semble donc que, sans qu'il y ait véritablement proportionnalité inverse, le passage du médicament à travers la membrane soit d'autant plus faible que I est élevé, les autres caractéristiques de la solution demeurant inchangées.

Figure 31

DICLOFENAC $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l: INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE

■ tampon phosphates, $I = 1,807 \cdot 10^{-1}$
 ■ tampon phosphates, $I = 2,322 \cdot 10^{-1}$
 ■ tampon phosphates, $I = 2,516 \cdot 10^{-1}$
 ● tampon borique, $I = 1,260$



III.5.1.7 Influence du Diclofénac et de la formulation sur la conductivité à travers la cornée et son épaisseur

D'une manière générale, le Diclofénac abaisse la conductivité électrique à travers la cornée, par rapport à celle observée pour le véhicule seul.

La concentration en principe actif est sans incidence significative sur le niveau général de conductivité, à pH 7,38 aussi bien qu'à pH 6,81 (Fig.32).

Le pH n'influe pas sur la conductivité dans le sens auquel on pourrait s'attendre, c'est-à-dire en l'augmentant d'autant plus que la proportion de forme dissociée est élevée.

Le Tween^R 80 à 0,50 % ne modifie pas l'image de conductivité par rapport à celle d'un témoin. En revanche, à une valeur approximativement égale à la CMC, la conductivité est considérablement abaissée, probablement en relation avec la formation de micelles. Au-dessous de la CMC, on observe une valeur intermédiaire entre celles dues aux deux extrêmes de concentration en tensio-actif.

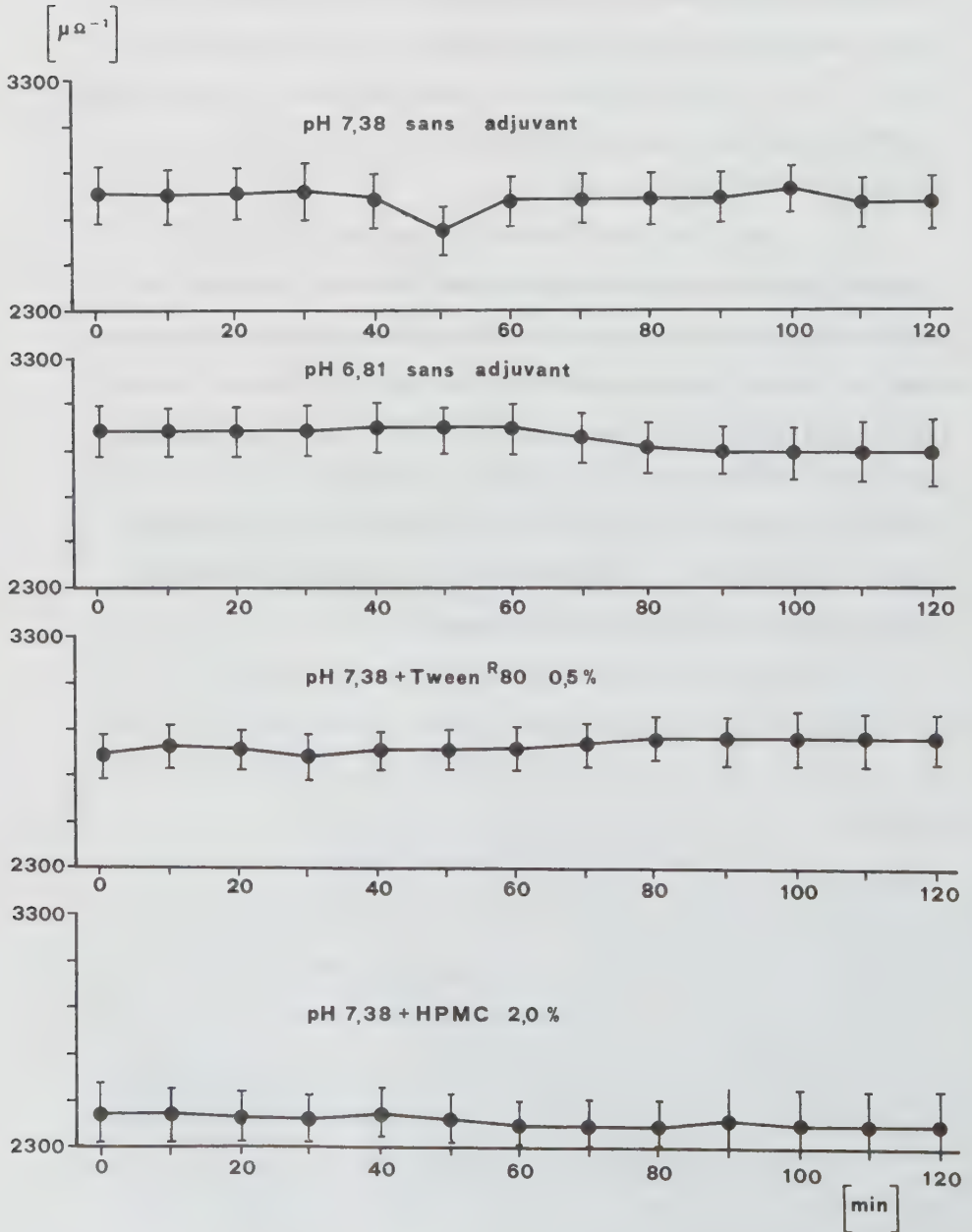
L'hydroxypropylméthylcellulose exerce une action négative sur la vitesse de transport, à pH 7,38 et à pH 6,81. La conductivité est fortement abaissée par rapport à celle du témoin. L'agent viscosifiant diminue probablement la mobilité ionique, d'où cette baisse qui, de plus, peut ne pas être étrangère à l'action de l'adjuvant sur la cornée elle-même.

La nature du tampon exerce une influence importante sur la conductivité; le système borax / acide borique donne une image continue de conductivité à un niveau de moitié inférieur à celui observé pour le tampon phosphate sans potassium. Le changement de la nature du cation, dans le même tampon, n'influe pas sur le niveau moyen de la conductivité, mais seulement sur sa régularité, plus grande avec K^+ qu'avec Na^+ .

Dans les expériences comportant la dilution du tampon phosphate pour en modifier la force ionique, on constate que cette dernière n'intervient pratiquement pas sur le niveau de conductivité; on note simplement un profil régularisé avec les deux solutions les plus diluées. Seule la solution borax / acide borique, de force ionique élevée, abaisse fortement la conductivité, certainement plus à cause de ses composants et de leur concentration que de la force ionique elle-même.

Figure 32

DICLOFENAC $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l: PROFILS DE CONDUCTIVITE



T a b l e a u 11

Résultats expérimentaux

Solutions tampon et adjuvants selon tableau 10 p. 110

CONDITIONS	$P \times 10^{10}$ [cm sec ⁻¹] (a)	Pente b $\times 10^8$ [mol sec ⁻¹] (b)	Variance sur la pente S_b $\times 10^{17}$ (c)	R (d)	C_i (e)	Conducti- vité moyenne [$\mu\Omega^{-1}$] (f)	s (g)	Epaisseur moyenne [mm] (h)	s (i)
1,25 . 10 ⁻³ mol/l, pH 7,38, tampon A1	1,33	7,84	22,21	---	1,037	2650	132	0,40	0,01
2,50 . 10 ⁻³ mol/l									
pH 6,24, tampon A4	23,92	13,45	0,18	---	1,66	2755	84	0,40	0,01
pH 6,81, tampon A5	23,01	12,94	10,52	---	1,55	3000	0	0,39	0,01
pH 7,38, tampon A1	8,67	4,76	57,26	---	0,65	3135	34	0,41	0,01
pH 8,04, tampon A6	4,12	2,37	2,50	---	0,25	2300	11	0,39	0,01

T a b l e a u 11 (suite)

CON D I T I O N S	$P \times 10^{10}$ [cm sec ⁻¹] (a)	Pente b $\times 10^8$ [mol sec ⁻¹] (b)	Variance sur la pente S_b $\times 10^{17}$ (c)	R (d)	% C ₁ (e)	Conducti- vité moyenne [m ⁻¹] (f)	s (g)	Epaisseur moyenne [mm] (h)	s (i)
5,00 . 10 ⁻³ mol/l									
pH 6,81, tampon A5	13,07	7,35	22,03	---	0,87	2985	37	0,39	0,01
pH 7,38, tampon A1, force ionique I = 2,516 . 10 ⁻¹	9,36	5,27	0,52	---	0,62	2842	42	0,40	0,01
pH 7,38, tampon A2, force ionique I = 2,322 . 10 ⁻¹	10,93	6,15	45,28	---	0,74	2833	15	0,40	0,01
pH 7,38, tampon A3, force ionique I = 1,807 . 10 ⁻¹	13,18	7,41	0,67	---	0,81	2767	58	0,40	0,00
pH 7,38, tampon B	6,32	3,55	1,03	---	0,46	2833	115	0,40	0,01
pH 7,38, tampon C, force ionique I = 1,146	7,63	4,29	4,37	---	0,53	1367	23	0,40	0,01
pH 6,81, tampon A5 + HPMC 2,00 %	5,88	3,39	0,18	0,462	0,43	2247	66	0,39	0,01
pH 7,38, tampon A1 + HPMC 2,00 %	4,40	2,47	0,21	0,470	0,29	2450	19	0,40	0,01
pH 7,38, tampon A1 + T80 0,0013 %	10,31	5,80	2,89	1,101	0,71	2500	100	0,40	0,01
pH 7,38, tampon A1 + T80 0,0130 %	9,44	5,31	5,95	1,008	0,67	2233	29	0,40	0,00
pH 7,38, tampon A1 + T80 0,5000 %	7,46	4,19	1,01	0,796	0,45	2831	37	0,40	0,00

(a) coefficient de perméabilité apparent

(b) rapport entre vitesses de transport avec et sans adjuvant

(c) % de la concentration appliquée retrouvé dans l'humeur aqueuse artificielle

T a b l e a u 11 b i s

Expériences comparées 2 à 2 par le test de t de Student

No des expériences selon tableau 10, p. 110

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	++	++	o	o	++	++	++	++	o	++	++	++	o	++	++
2		o	o	++	+	o	++	++	++	++	+	o	o	++	++
3			o	++	++	++	++	++	++	++	++	o	o	++	++
4				o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
5					++	++	++	++	o	++	++	++	o	++	++
6						o	++	++	++	++	++	++	o	++	o
7							++	++	++	o	++	o	o	++	+
8								o	++	++	++	++	++	++	++
9									++	++	++	++	++	++	++
10										++	++	++	o	++	++
11											++	++	o	o	++
12												o	o	++	++
13													o	++	++
14														o	o
15															++

+ valeur significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ $p = 0,05$

++ valeur très significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ $p = 0,01$

o valeur non significative si $t_{\text{calc.}} < t_{\text{table}}$ $p = 0,05$

IV. Conclusions et résumé

Nous avons consacré ce travail à la mise au point d'un modèle permettant de maintenir fonctionnelle "in vitro" une cornée de lapin, pour étudier le rôle de la formulation dans le passage des principes actifs à travers ce tissu.

Après un exposé des notions biopharmaceutiques relatives aux médicaments ophtalmiques, la deuxième partie décrit le modèle de cellule, ainsi que l'infrastructure d'alimentation en milieu nutritif et de contrôle.

Les éléments suivants sont exposés:

- construction de la cellule et du dispositif de fixation de la cornée.
- apport en milieu nutritif permettant la survie du tissu, oxygénation de cette solution et circulation dans le système simulant l'humeur aqueuse, technique expérimentale.
- contrôle de la survie effective du tissu par examen microscopique et mesure de l'épaisseur au moyen de la lampe à fente.
- mesures de conductivité électrique destinées à contrôler l'étanchéité du système et les variations importantes de l'état physiologique du tissu.
- expériences pour déterminer la reproductibilité des résultats, avec la procaine et l'éphédrine. L'analyse statistique des résultats montre que les quantités de principe actif passant la barrière cornéenne sont reproductibles, lorsque toutes les précautions expé-

riminentales sont respectées. Il faut constater que, dans tous les cas, seules des quantités très faibles de médicament passent la barrière cornéenne.

- examen histologique de la cornée en microscopie électronique, pour juger des lésions causées par le prélèvement des tissus et les milieux auxquels ils sont soumis. Aux valeurs de pH de 7,38 et de 6,81, on observe des modifications de structure peu importantes pour le fonctionnement de la cornée. A pH 6,24 et 8,04, les altérations sont plus marquées. Dans tous les cas, il s'agit de désordres réversibles.

Le modèle mis au point est donc apte à remplir la fonction à laquelle il est destiné.

La troisième partie du travail expose les résultats obtenus au moyen du modèle. Les expériences ont porté sur la procaine, l'éphédrine, l'oxyphenbutazone et un anti-inflammatoire nouveau: le Diclofénac (DCI).

L'importance de la procédure expérimentale a été mise en évidence: des changements dans le transport sont constatés si l'on traite préalablement les tissus sous perfusion avec de la solution tampon. Dans ce dernier cas, on observe une plus grande régularité de la vitesse de transport et des autres paramètres mesurés, grâce à l'équilibre qui s'est établi entre la cornée et le milieu.

Avec les médicaments expérimentés, nous faisons les observations résumées ci-après:

Procaïne HCl

Le passage de ce principe actif à travers la cornée est constaté dans toutes les conditions expérimentales. Le pH, qui conditionne la proportion de forme non ionisée, joue un rôle important. Le transport est d'autant plus rapide que la valeur du pH est élevée, puisque la procaïne est une base faible, moins dissociée en milieu alcalin.

Les tensio-actifs non ioniques entraînent, tant à des concentrations proches de la CMC que plus élevées, une augmentation de la vitesse de transport. Les tensio-actifs cationiques et anioniques agissent dans le même sens, mais avec une plus grande intensité. De tous les adjuvants employés, ce sont ces derniers qui ont la plus forte action positive, par un mécanisme à la fois physico-chimique et physiologique.

La méthylcellulose abaisse la vitesse de transport et la quantité de principe actif retrouvée dans l'humour aqueuse artificielle, à la fois par sa viscosité et par la formation probable d'un complexe avec la procaïne.

Ephédrine HCl

Deux expériences ont été effectuées pour déterminer la reproductibilité des résultats avec un autre principe actif que la procaïne. Nous constatons que l'éphédrine passe effectivement la cornée. Le traitement préalable de la face épithéliale par le véhicule seul ralentit et régularise le transport en fonction du temps.

Oxyphenbutazone (OPB)

Dans aucune des conditions expérimentales envisagées, il n'a été possible de déceler la présence d'OPB dans l'humeur aqueuse artificielle. Une pommade à 10 % en principe actif n'a également pas donné de résultats en ce sens. Un essai effectué avec de l'OPB ^{14}C montre que celle-ci est retenue dans la cornée. Le fait que, dans des expériences "in vivo", l'OPB soit retrouvée dans les différentes parties de l'oeil, laisse à penser que la voie de pénétration est préférentiellement conjonctivale.

Diclofénac

Ce produit a passé la cornée dans toutes les conditions expérimentales auxquelles il a été soumis.

La quantité retrouvée dans le milieu récepteur augmente avec la concentration appliquée, dans les limites de solubilité du produit; on ne constate pas de saturation.

Le transport de cet acide faible est d'autant plus important qu'il est moins dissocié, c'est à dire que le pH est plus bas.

Le Tween^R 80 exerce une action faiblement positive, à une concentration inférieure ou voisine de la CMC. A une concentration plus élevée, il ralentit le transport.

L'hydroxypropylméthylcellulose 60 HG (HPMC) diminue la vitesse de transport, aux valeurs de pH où son effet a été étudié.

Le type de tampon influe sur la vitesse de transport qui est diminuée par la présence de K^+ et ne change pas dans le système tampon borax / acide borique, à valeurs de pH égales.

Enfin, la force ionique de la solution diminue d'autant plus la vitesse de transport que sa valeur est élevée, pour un même type de solution tamponnée.

Dans les essais où le principe actif passe la cornée, nous avons pu observer une cinétique de premier ordre et une diffusion passive à travers le tissu.

Différents parallèles restent à établir avec ce qui se passe "in vivo", où interviennent des éléments absents de l'expérimentation avec un tissu sous perfusion (action mécanique des paupières, pellicule lacrymale).

BIBLIOGRAPHIE

1. MAURICE D.-M., Ophthalmol. Lit., 7, 3 (1953).
2. ANTONIBON A., Ann. Ottal. e Clin. Oculist., 57, 58 (1929).
3. SWAN K.-C. ET WHITE N., Amer. J. Ophthal., 25, 1043 (1942).
4. SOEHRING K., KLINGMÜLLER O. ET NEUWALD F., Arzneim. Forsch., 9, 297 (1959).
5. HONEGGER H., Klin. Mbl. Augenheilk., 139, 38 (1961).
6. FENTON A.-H., Pharm. J., 166, 6 (1951).
7. MAURICE D.-M., Brit. J. Ophthal., 39, 463 (1955).
8. LEOPOLD I.-H., Arch. Ophthalmol., 34, 99 (1944).
9. SWAN K.-C., Amer. J. Ophthal., 27, 1118 (1944).
10. RODMAN-IRVINE S., Amer. J. Ophthal., 29, 1317 (1946).
11. BELLOWS J.-G. ET GUTMANN M., Arch. Ophthalmol., 30, 352 (1943).
12. FELDMAN J.-B., DE LONG P. ET BROWN C., Arch. Ophthalmol., 40, 668 (1948).
13. SWAN K.-C., Arch. Ophthalmol., 33, 378 (1945).
14. MÜLLER W.-H. ET DEARDORFF D.-L., J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed., 45, 334 (1956).
15. HAAS J.-S. ET MERRILL D.-L., Amer. J. Ophthal., 54, 21 (1962).
16. ADLER C.-A., MAURICE D.-M. ET PATERSON M.-E., Exp. Eye Res., 11, 34 (1972).
17. HOLT M. ET COGAN D.-G., Arch. Ophthalmol., 35, 292 (1946).
18. DONN A., MAURICE D.-M. ET MILLS N.-L., Arch. Ophthalmol., 62, 741 (1959).
19. BABBOIT E., Arch. Ophthalmol., 57, 117 (1959).
20. EHLERS N. ET EHLERS D., Acta Ophthalmol., 44, 539 (1966).

21. STEINKE G., Biopharmazeutische Aspekte der Augenarznei-
zubereitung, in: Ophthalmica, vol. I, Pharmazeutische
Grundlagen ihrer Zubereitung, APV, pp. 20 - 60, Wissen-
schaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1975.
22. MÜLLER F., KROGERUS V.-E. ET VUORINEN L., Pharm. Acta
Helv., 43, 338 (1968).
23. BRUNNER B. ET SPEISER P.-P., Arzneim. Forsch., 20, 1610
(1970).
24. DODEN W., Klin. Mbl. Augenheilk., 131, 237 (1957).
25. WEEKERS J.-F., Arch. Ophthalmol. (Paris), 34, 121 (1974).
26. GREEN K. ET OTORI T., Exp. Eye Res., 9, 268 (1970).
27. MC CAREY B.-E., EDELHAUSER H.-F. ET VAN HORN D.-L.,
Invest. Ophthalmol., 12, 410 (1973).
28. GREEN K., Exp. Eye Res., 5, 106 (1966).
29. GREEN K., Amer. J. Physiol., 209, 1311 (1965).
30. KAYE G.-I., PAPPAS G.-D., DONN A. ET MALLET N.-L.,
J. Cell. Biol., 12, 481 (1962).
31. HALE P.-N. ET MAURICE D.-M., Exp. Eye Res., 8, 205 (1969).
32. KLYCE S.-D., NEUFELD A.-H. ET ZADUNAISKY J.-A., Invest.
Ophthalmol., 12, 127 (1973).
33. FISCHBARG J., Biochim. Biophys. Acta, 288, 362 (1972).
34. RILEY M.-V., CAMPBELL D. ET LINZ D.-H., Exp. Eye Res.,
15, 677 (1973).
35. KLYCE S.-D., J. Physiol., 226, 407 (1972).
36. EHLERS N., Exp. Eye Res., 15, 553 (1973).
37. EHLERS N., Acta Physiol. Scand., 78, 471 (1970).
38. WEEKERS J.-F. ET VAN DER HEYDEN CH., Ann. Oculist. (Paris),
206, 495 (1973).
39. KROHN D.-L. ET BREITFELDER J., Invest. Ophthalmol.,
13, 312 (1974).

40. HULL D.-S., HINE J.-E., EDELHAUSER F. ET HYDIUK R.-A.,
Invest. Ophthalmol., 13, 457 (1974).
41. BARRELET J., TSACOPOULOS M. ET BURI P., J. Pharm.
Pharmac., 27, 819 (1975).
42. DAVSON H., The Eye, Vol. I: Vegetative Physiology and
Biochemistry, Academic Press, New-York and London, 1969.
43. DAVSON H., Physiology of the Eye, 3rd ed., Churchill
Livingstone, Edinburgh and London, 1972.
44. BOTELHO S.-Y., Scientific American (Oct. 1964).
45. EHLERS N., Acta Anat., 75, 161 (1970).
46. MAURICE D.-M., J. Physiol., 136, 263 (1957).
47. BERLINER M.-L., Biomicroscopy of the Eye, Vol. I, Paul-B.
Hoerber Inc., Medical Department of Harper and Brothers,
New-York, 1949.
48. DUKE-ELDER, System of Ophthalmology, Vol. II: The Anato-
my of the Visual System, Henty Kimpton, London, 1961.
49. DEODATI F. ET BEC P., Arch. Ophtalmol. (Paris), 29,
239 (1969).
50. POTTS A.-M., Amer. J. Ophtahl., 36, 127 (1953).
51. HAMASINGE S. ET POTTS A.-M., Amer. J. Ophthal., 40, 211
(1955).
52. MUNZEL K., Pharm. Ztg., 106, 304 (1961).
53. VAN HOOSE C. ET LEADERS F.-E., Invest. Ophthalmol.,
13, 377 (1974).
54. LEE M. ET HAMMARLUND E.-R., J. Pharm. Sci., 63, 721 (1974).
55. BENSON H., Arch. Ophthalmol., 91, 313 (1974).
56. DEARDORFF D.-L., Ophthalmic Preparations, in: Remington's
Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1488 - 1508, Mack
Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1975.
57. MISHIMA S. ET HEDBYS B.-O., Exp. Eye Res., 6, 10 (1967).
58. GREEN K. ET GREEN M.-A., Amer. J. Physiol., 217, 635
(1969).

59. DONN A., MILLER S.-L. ET MALLETT N.-M., Arch. Ophthalmol., 70, 515 (1963).
60. GREEN K., Exp. Eye Res., 6, 79 (1967).
61. KINSEY V.-E., cité par ADLER F.-H., Physiology of The Eye, Mosby, St. Louis, 1950.
62. KINSEY V.-E., Arch. Ophthalmol., 50, 401 (1953).
63. CHINN A. ET BELLOWES J.-G., Arch. Ophthalmol., 27, 34 (1942).
64. MAURICE D.-M., Exp. Eye Res., 15, 527 (1973).
65. MARSH R.-J. ET MAURICE D.-M., Exp. Eye Res., 11, 43 (1971).
66. MAURICE D.-M., Invest. Ophthalmol., 6, 464 (1967).
67. MAKOID M.-C., SIEG J.-W. ET ROBINSON J.-R., J. Pharm. Sci., 65, 150 (1976).
68. LEMP M.-A., HOLLY F.-J., IWATA S. ET DOHLMAN C.-H., Arch. Ophthalmol., 83, 89 (1970).
69. USSING H.-H. ET ZERAHN K., Acta Physiol. Scand., 23, 110 (1951).
70. KAYE G.-I., SILBEY R.-C. ET HOEFLE F.-B., Exp. Eye Res., 15, 585 (1973).
71. MISHIMA S. ET KUDO T., Invest Ophthalmol., 6, 329 (1967).
72. KAYE G.-I., MISHIMA S., COLE J.-D. ET KAYE N.-W., Invest. Ophthalmol., 7, 53 (1968).
73. MC CAREY B.-E., EDELHAUSER H.-F. ET VAN HORN D.-L., Invest. Ophthalmol., 12, 410 (1973).
74. RITSCHER W.-A., Deutsch. Apot. Ztg., 108, 1029 (1967).
75. HIND H.-W. ET GOYAN F.-M., J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed., 36, 33 (1947).
76. RAMER R.-M. ET GASSET A.-R., Annals of Ophthal., 6, 1160 (1974).
77. RAMER R.-M. ET GASSET A.-R., Annals of Ophthal., 7, 25 (1975).

78. STIERLIN H., TAMS G., WHILELMI E. ET DRAEGER J., Ophthalmol. Res., 5, 257 (1973).
79. HARDBERGER R., HANNA C. ET BOYD C.-M., Arch. Ophthalmol., 93, 42 (1975).
80. HANNA C. ET SHARP J.-D., Arch. Ophthalmol., 88, 196 (1972).
81. SIEG J.-W. ET ROBINSON R., J. Pharm. Sci., 64, 931 (1975).
82. RIEGELMAN S. ET VAUGHAN D.-G., J. Am. Pharm. Ass. Pract. Ed., 19, 474, 537, 665 (1958).
83. COWLE J.-B. ET ANDERSON R.-A., Transact. Ophthal. Soc. Austral., 26, 110 (1967).
84. ANDERSON R.-A. ET COWLE J.-B., Brit. J. Ophthal., 52, 607 (1968).
85. NOTARI R.-E., Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, an Introduction, Marcel Drekker Inc., New-York, 1971.
86. MAYERSOHN M., GIBALDI M. ET GRUNDHOFER B., J. Pharm. Sci., 60, 1813 (1971).
87. WANG E.-S. ET HAMMARLUND E.-R., J. Pharm. Sci., 59, 1559 (1970).
88. BOBERG-ANS J., GROVE-RASMUSSEN K.-V. ET HAMMARLUND E.-R., Brit. J. Ophthal., 43, 670 (1959).
89. FRIEDENWALD J.-S., HUGUES W.-F. ET HERRMANN H., Arch. Ophthalmol., 31, 279 (1944).
90. TROLLE-LASSEN C., Pharm. Wbl., 93, 148 (1958).
91. VAN OOTEGHEM M. ET SCHLUMPF R., Oberflächenaktivität, in: Ophthalmica, Vol. I, Pharmazeutische Grundlagen ihrer Zubereitung, APV, pp. 123 - 130, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1975.
92. BLUMCKE S., NIERDORF H.-R., RODE J. ET KUDZUS G., Zeitschr. für Zellforsch., 82, 589 (1967).
93. MAURICE D.-M., Symposium on Drug Action on the Eye, London, p. 49 (1969).

94. ROUFFIAC M., Bull. Pharm. de Réserve, 1, 93 (1971).
95. VAN OOTEGHEM M. ET FRAUCH P., Viskosität, in: Ophthalmica, Vol. I, Pharmazeutische Grundlagen ihrer Zubereitung, APV, pp. 100 - 122, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1975.
96. BLAUGH S.-M. ET CANADA A.-T., Amer. J. Hosp. Pharm., 22, 662 (1965).
97. RUBIN A.-J., STENZELL K.-H., MIYATA T., WHITE M.-J. ET DUNN M., J. Clin. Pharm., 13, 309 (1973).
98. SKINNER F.-S., Pharm. Ind., 33, 677 (1971).
99. KRAGH-NIELSEN G. ET MUNZEL K., Pharm. Acta Helv., 35, 301 (1960).
100. MATTHÄUS W., Klin. Mbl. Augenheilk., 138, 227 (1961).
101. HIGUCHI T., J. Pharm. Sci., 50, 874 (1961).
102. MUELLER F., Informationsdienst APV, 13, 79 (1967).
103. BURCH P.-G. ET MIGEON C.-J., Arch. Ophthalmol., 79, 174 (1968).
104. NURSALL J.-F., Amer. J. Ophthal., 59, 29 (1965).
105. ROSENBLUM C., DENGLER R.-E. ET GEOFFROY R.-F., Arch. Ophthalmol., 77, 234 (1967).
106. JANES R.-J. ET STILES J.-F., Amer. J. Ophthal., 56, 84 (1963).
107. DE BERNARDINIS E. ET BONA VOLONTÀ G., Rass. Ital. Ottal., 22, 157 (1953).
108. POTTS A.-M., The Effects of Drugs upon the Eye, in: Physiological Pharmacology, ed. by Root W.-S. and Hofmann F.-G., pp. 329 - 397, Academic Press, New-York and London, 1965.
109. SWAN K.-C., Arch. Ophthalmol., 41, 253 (1949).
110. LEOPOLD I.-H. ET SCHLEIE H.-G., Arch. Ophthalmol., 29, 811 (1943).

111. BESWICK A.-J., LANGLEY R. ET MC CULLOCH C., Amer. J. Ophthal., 46, 3 (1958).
112. BELLOWES J.-G. ET CHINN H., Arch. Ophthalmol., 25, 294, (1941).
113. CHRAI S.-S., MAKOID M.-C., ERIKSEN S.-P. ET ROBINSON J.-R., J. Pharm. Sci., 63, 333 (1974).
114. SMOLEN V.-F. ET SCHOENENWALD R.-D., J. Pharm. Sci., 63, 1580 (1974).
115. GREEN K. ET DOWNS S.-J., Invest. Ophthalmol., 13, 316 (1974).
116. ASSEFF C.-F., WEISMAN R.-L., PODOS S.-M. ET BECKER B., Amer. J. Ophthal., 75, 212 (1973).
117. WALTMAN S.-R. ET KAUFMAN H.-E., Invest. Ophthalmol., 9, 250 (1970).
118. PATTON T.-F. ET ROBINSON J.-R., J. Pharm. Sci., 64, 267 (1975).
119. -, Drug Ther. Bull., 11, 55 (1973).
120. GINSBURG M. ET ROBSON J.-M., Brit. J. Ophthal., 33, 574 (1949).
121. GINSBURG M. ET ROBSON J.-M., Brit. J. Ophthal., 29, 185 (1945).
122. KAYE G.-I., HOEFLE B. ET DONN A., Invest. Ophthalmol., 12, 98 (1973).
123. GIARDINI A. ET ROBERTS J.-R.-E., Brit. J. Ophthal., 34, 737 (1950).
124. TURSS R., FRIEND J. ET DOHLMAN C.-H., Exp. Eye Res., 9, 254 (1970).
125. FATT I. ET BIEBER M.-I., Exp. Eye Res., 7, 103 (1968).
126. LANGHAM M.-E., J. Physiol., 117, 461 (1952).
127. MERRIAM F.-C. ET KINSEY V.-E., Arch. Ophthalmol., 43, 979 (1950).

128. MAURICE D.-M. ET GIARDINI A.-A., Brit. J. Ophthal., 35, 169 (1951).
129. MC DONALD T.-O., BALDWIN H.-A. ET BEASLEY C.-H., J. Soc. Cosmet. Chem., 24, 163 (1973).
130. BALDWIN H.-A., MC DONALD T.-O. ET BEASLEY C.-H., J. Soc. Cosmet. Chem., 24, 181 (1973).
131. GREEN K., Life Sciences, Vol. V, p. 2309, Pergamon Press Ltd, 1966.
132. SHAPIRO M. ET CANDIA O.-A., Exp. Eye Res., 15, 659 (1973).
133. HODSON S., Exp. Eye Res., 11, 20 (1971).
134. HARRIS J.-E. ET NORDQUIST L.-I., Amer. J. Ophthal., 40, 100 (1955).
135. MAURICE D.-M., J. Physiol., 221, 43 (1972).
136. ZADUNAISKY J.-A., LANDE M.-A., CHALFIE M. ET NEUFELD A.-H., Exp. Eye Res., 15, 277 (1973).
137. OTORI I., Exp. Eye Res., 6, 356 (1967).
138. POTTS A.-M. ET MODRELL R.-W., Amer. J. Ophthal., 44, 284 (1957).
139. MC CAREY B.-E. ET KAUFMAN H.-E., Invest. Ophthalmol., 13, 165 (1974).
140. CAPELLA J.-A., KAUFMAN H.-E. ET ROBBINS J.-E., Cryobiology, 2, 116 (1965).
141. RITSCHER W., Angewandte Biopharmazie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart, 1973.
143. NORTHROP J.-N. ET ANSON M.-L., J. Gen. Physiol., 12, 543 (1929).
144. CREVOISIER C., Thèse no 1676, Université de Genève, 1974.
145. STEIN W.-D., The Movement of Molecules across Cell Membranes, Vol. VI, Academic Press, New-York and London, 1967.
146. LUECK L.-M., WURSTER D.-E., HIGUCHI T., LEMBERGER A.-P. ET BUSSE L.-W., J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed., 46, 80 (1957).

147. NOGAMI H., NOGAI T. ET SONOBE T., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 18, 2101 (1970).
148. FITES A.-L., BANKER G.-S. ET SMOLEN V.-F., J. Pharm. Sci., 59, 610 (1975).
149. GRARD F., LRL Berkeley, UCRL-10153 (1962).
150. BATES T.-S., GIBALDI M. ET KANIG J.-L., J. Pharm. Sci., 55, 191 (1966).
151. NATH B.-S. ET SHINGBAL D.-M., Ind. J. Pharm., 36, 107 (1974).
152. JONADET M., Revue Médicale de Tours, 17, 525 (1961).
153. BRUNO S. ET LUPOLI G., Il Farmaco Ed. Sc., 11, 462 (1956).
154. BURGEN A.-S.-V. ET MITCHELL J.-F., Gaddum's Pharmacology, 6th ed., Oxford Medical Publications, 1968.
155. REISER K.-A., Klin. Mbl. Augenheilk., 121, 257 (1952).
156. MIKKELSON TH.-I., CHRAI S.-S. ET ROBINSON J.-R., J. Pharm. Sci., 62, 1648 (1973).
157. U.S. DPT. OF COMMERCE, NATIONAL BUREAU OF STANDARDS, Critical Micelle Concentrations of Aqueous Systems, 1970.
158. -, Drug Ther. Bull., 10, 81 (1972).
159. STIERLIN H., Protocole de Laboratoire Ciba-Geigy, 1972.
160. PATEL N.-K. ET FOSS N.-E., J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed., 47, 289 (1958).
161. MAYERSOHN M., GIBALDI M. ET GRUNDHOFER B., J. Pharm. Sci., 60, 1813 (1971)

